

Modifikasi Biosensor Konduktometri Menggunakan *Screen Printed Carbon Electrode* (SPCE) dengan Urease pada Membran Kitosan untuk Mendeteksi Urea

SKRIPSI

oleh:

DIAN NUR FAJARIATI

125090200111003



**JURUSAN KIMIA
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2016**

Modifikasi Biosensor Konduktometri Menggunakan *Screen Printed Carbon Electrode* (SPCE) dengan Urease pada Membran Kitosan untuk Mendeteksi Urea

SKRIPSI

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

oleh:

DIAN NUR FAJARIATI

125090200111003



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

MALANG

2016

LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI

Modifikasi Biosensor Konduktometri Menggunakan *Screen Printed Carbon Electrode* (SPCE) dengan Urease pada Membran Kitosan untuk Mendeteksi Urea

oleh:

DIAN NUR FAJARIATI
125090200111003

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

Dra. Anna Roosdiana, M. App., Sc

NIP. 19580711 199203 2 002

Mengetahui,
Ketua Jurusan Kimia
Fakultas MIPA Universitas Brawijaya

Dr. Edi Priyo Utomo, MS

NIP. 19571227 198603 1 003

LEMBAR PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Dian Nur Fajariati

NIM : 125090200111003

Jurusan : Kimia

Penulis skripsi berjudul:

Modifikasi Biosensor Konduktometri Menggunakan *Screen Printed Carbon Electrode* (SPCE) dengan Urease pada Membran Kitosan untuk Mendeteksi Urea

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 tugas akhir ini.
2. Apabila dikemudian hari ternyata skripsi yang saya tulis terbukti hasil jiplakan, maka saya akan bersedia menanggung segala resiko yang akan saya terima.

Demikian pernyataan ini dibuat dengan segala kesadaran.

Malang, Januari 2016

Yang menyatakan,

(Dian Nur Fajariati)

NIM. 125090200111003

Modifikasi Biosensor Konduktometri Menggunakan *Screen Printed Carbon Electrode* (SPCE) dengan Urease pada Membran Kitosan untuk Mendeteksi Urea

ABSTRAK

Biosensor urea konduktometri didasarkan pada reaksi hidrolisis urea oleh urease. Massa urease mempengaruhi hasil hidrolisis urea dan kinerja biosensor. Pada penelitian ini mempelajari pengaruh massa urease terhadap kinerja biosensor. Biosensor dibuat dari *Screen Printed Carbon Electrode* (SPCE) yang dilapisi 5 μL kitosan 1%, 10 μL glutaraldehid 0,5%, dan urease. Jumlah urease yang dipelajari adalah 0,06 mg; 0,12 mg; 0,18 mg; 0,31 mg; 0,43 mg; 0,55 mg; 0,61 mg; dan 0,68 mg pada tebal membran 0,03 mm, dan luas SPCE $1 \times 5 \text{ mm}^2$. Konsentrasi urea adalah 0 hingga 0,5 ppm dalam buffer fosfat 0,01 M pH 8. Hasil penelitian menunjukkan kinerja biosensor terbaik dihasilkan pada massa urease 0,18 mg. Kinerja biosensor pada kondisi tersebut adalah sensitivitas 142 $\mu\text{S/ppm}$, batas deteksi 0,05 ppm, dan kisaran konsentrasi linier urea 0,05 hingga 0,2 ppm.

Kata Kunci: biosensor urea, konduktometri, urease, membran kitosan, *Screen Printed Carbon Electrode* (SPCE)

Modification of Conductometric Biosensor Use *Screen Printed Carbon Electrode* (SPCE) with Urease in Chitosan Membrane for Urea Determination

ABSTRACT

Conductometric urea biosensor based on hydrolysis of urea by urease. Urease mass affect the result of urea hydrolysis and the performance of biosensor. The research studied about the effect of urease mass to the performance of biosensor. The biosensor was made from *Screen Printed Carbon Electrode* (SPCE) which coated 5 μL 1% chitosan, 10 μL 0.5% glutaraldehyde, and urease. The mass of ureases were 0.06 mg; 0.12 mg; 0.18 mg; 0.31 mg; 0.43 mg; 0.55 mg; 0.61 mg; and 0.68 mg on 0.03 mm membrane thickness, 1x5 mm² SPCE area. The urea concentrations were 0 to 0.5 ppm in 0.01 M phosphate buffer pH 8. The results showed that the best performance of biosensor on 0.18 mg urease mass. The performances of biosensor were sensitivity of 142 $\mu\text{S/ppm}$, detection limit of 0.05 ppm, range of linear urea concentration of 0.05 to 0.2 ppm.

Keywords: chitosan membrane, conductometric, *Screen Printed Carbon Electrode* (SPCE), urease, urea biosensor

KATA PENGANTAR

Puji syukur kehadiran Allah SWT atas nikmat, rahmat, hidayah, dan karunia-Nya diberikan pada penulis sehingga dapat menyelesaikan penelitian dan penulisan skripsi dengan baik, yang berjudul **Modifikasi Biosensor Konduktometri Menggunakan Screen Printed Carbon Electrode (SPCE) dengan Urease pada Membran Kitosan untuk Mendeteksi Urea**. Skripsi ini ditulis sebagai salah satu syarat mendapatkan gelar Sarjana Sains dalam bidang Kimia Fakultas MIPA Universitas Brawijaya. Penulisan skripsi ini tak lepas dari bimbingan, bantuan, serta dukungan berbagai pihak, maka penulis mengucapkan terima kasih kepada:

1. Dr. Ani Mulyasuryani, MS selaku dosen pembimbing I dan dosen penasehat akademik atas segala bimbingan, saran, perhatian, dan doa yang telah diberikan.
2. Dra. Anna Roosdiana, M. App., Sc selaku dosen pembimbing II atas segala segala bimbingan, saran, perhatian, dan doa yang telah diberikan.
3. Dr. Edi Priyo Utomo, MS., selaku Ketua Jurusan Kimia, serta segenap staf pengajar Jurusan Kimia untuk bimbingan dan ilmu yang telah diberikan kepada penulis selama studi.
4. Kedua orangtua yang telah mendukung, memberi kasih sayang, dan doa yang diberikan dalam menyelesaikan skripsi ini.
5. Teman-teman seperjuangan Kimia Analitik dan Kimia A 2012 yang telah menemani, memberi dukungan, dan doa dalam menyelesaikan skripsi ini.
6. Semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu persatu yang telah membantu, memberi saran, dukungan, dan doa dalam menyelesaikan skripsi ini.

Akhir kata, semoga skripsi ini bermanfaat bagi para pembaca mengenai biosensor urea konduktometri.

Malang, Januari 2016

Penulis

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PENGESAHAN	ii
HALAMAN PERNYATAAN	iii
ABSTRAK	iv
ABSTRACT	v
KATA PENGANTAR	vi
DAFTAR ISI	vii
DAFTAR GAMBAR	ix
DAFTAR TABEL	x
DAFTAR LAMPIRAN	xii
BAB I PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	3
1.3 Batasan Masalah	3
1.4 Tujuan Penelitian	4
1.5 Manfaat Penelitian	4
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	
2.1 Biosensor	5
2.2 Transduser Konduktometri	5
2.3 Laju Reaksi Enzimatis	7
2.4 Metode Amobilisasi	10
2.5 Kitosan sebagai Media Amobilisasi	11
2.6 Biosensor Konduktometri Urea	13
BAB III METODE PENELITIAN	
3.1 Tempat dan Waktu Penelitian	15
3.2 Alat dan Bahan Penelitian	15
3.3 Tahapan Penelitian	15
3.4 Cara Kerja	16
3.4.1 Pembuatan Biosensor Konduktometri Urea	16
3.4.2 Pengaruh Massa Urease	16
3.4.3 Karakterisasi Biosensor	16
3.5 Pengolahan Data	17
a. Penentuan sensitivitas biosensor	17
b. Penentuan batas deteksi biosensor	17
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN	
4.1 Pengaruh Massa Urease terhadap Kinerja Biosensor Konduktometri Urea	18

4.2 Karakterisasi Biosensor Konduktometri Urea	21
BAB V KESIMPULAN DAN SARAN	
5.1 Kesimpulan	24
5.2 Saran	24
DAFTAR PUSTAKA	25
LAMPIRAN	28

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 : Komponen penyusun biosensor	5
Gambar 2.2 : Migrasi ion dalam larutan dan konduktivitas elektrolit	6
Gambar 2.3 : (a) Struktur molekul urease dari Jack Bean Meal, (b) Stereo diagram sisi aktif urease	8
Gambar 2.4 : Laju hidrolisis urea oleh urease dari <i>Canavalia ensiformis</i> pada 25 °C dan pH 7	9
Gambar 2.5 : Mekanisme reaksi ikatan silang kitosan dengan glutaraldehid	12
Gambar 4.1 : Hubungan antara daya hantar urea terhadap konsentrasi larutan urea 0 hingga 0,5 ppm	18
Gambar 4.2 : Hubungan antara konsentrasi urea dengan daya hantar larutan urea 0 hingga 0,5 ppm	21
Gambar 4.3 : Hubungan antara konsentrasi urea dengan daya hantar larutan urea 0 hingga 0,2 ppm	22
Gambar C.1 : Kurva baku BSA	42
Gambar C.2 : Kurva baku amonium	44
Gambar C.3 : Hubungan antara konsentrasi urea dengan daya Hantar, (a) 0 hingga 0,5 ppm; dan (b) 0 hingga 0,2 ppm	50

DAFTAR TABEL

Tabel 2.1 : Karakteristik urease dari <i>Schizosaccharomyces pombe</i> dan <i>Canavalia ensiformis</i> (Jack Bean)	8
Tabel 2.2 : Kondisi optimum enzimatis untuk amobilisasi urease pada berbagai media amobilisasi	10
Tabel 2.3 : Daya hantar molar ion pada hidrolisis urea oleh urease	14
Tabel 4.1 : Kinerja biosensor konduktometri urea pada berbagai massa urease dengan kisaran konsentrasi urea 0-0,5 ppm	20
Tabel 4.2 : Karakteristik biosensor urea konduktometri pada massa urease 0,18 mg	22
Tabel A.1 : Massa padatan KH_2PO_4 yang dibutuhkan untuk membuat larutan KH_2PO_4	31
Tabel A.2 : Massa padatan K_2HPO_4 yang dibutuhkan untuk membuat larutan K_2HPO_4	32
Tabel A.3 : Volume larutan KH_2PO_4 dan larutan K_2HPO_4 yang dibutuhkan untuk membuat buffer fosfat pH 8	33
Tabel A.4 : Volume BSA 10000 ppm yang dibutuhkan untuk membuat larutan BSA 1000-9000 ppm	35
Tabel A.5 : Volume larutan amonium 100 ppm yang dibutuhkan untuk membuat larutan amonium 0-5 ppm	37
Tabel A.6 : Volume larutan urea 50 ppm yang dibutuhkan untuk membuat larutan uji urea 0-0,6 ppm	38
Tabel C.1 : Serapan BSA pada 543 nm	42
Tabel C.2 : Serapan urease pada 543 nm	43
Tabel C.3 : Serapan amonium pada 400 nm	43
Tabel C.4 : Serapan urease pada 400 nm	44
Tabel C.5 : Konversi volume urease menjadi massa urease pada pengaruh massa urease	46
Tabel C.6 : Data daya hantar larutan urea pada massa urease 0,06 mg (5 μL)	47
Tabel C.7 : Data daya hantar larutan urea pada massa urease 0,12 mg (10 μL)	47
Tabel C.8 : Data daya hantar larutan urea pada massa urease 0,18 mg (15 μL)	47

Tabel C.9 : Data daya hantar larutan urea pada massa urease 0,31 mg (25 μ L)	48
Tabel C.10 : Data daya hantar larutan urea pada massa urease 0,43 mg (35 μ L)	48
Tabel C.11 : Data daya hantar larutan urea pada massa urease 0,55 mg (45 μ L)	48
Tabel C.12 : Data daya hantar larutan urea pada massa urease 0,61 mg (50 μ L)	49
Tabel C.13 : Data daya hantar larutan urea pada massa urease 0,68 mg (55 μ L)	49
Tabel C.14 : Data daya hantar larutan urea untuk penentuan sensitivitas dan batas deteksi pada konsentrasi urea 0 hingga 0,5 ppm	49
Tabel C.15 : Data daya hantar larutan urea untuk penentuan sensitivitas dan batas deteksi pada konsentrasi urea 0 hingga 0,2 ppm	50
Tabel C.16 : Data pengukuran daya hantar blanko penentuan batas deteksi biosensor konduktometri urea	51
Tabel C.17 : Perhitungan teoritis konsentrasi urea yang dapat dihidrolisis oleh urease pada berbagai massa urease selama 13 detik dan volume urea 0,3 mL	57

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran A. Preparasi Larutan	28
Lampiran A.1 Pembuatan larutan asam asetat 0,2 M dari asam asetat glasial 99,5%	28
Lampiran A.2 Pembuatan larutan natrium asetat 1 M	28
Lampiran A.3 Pembuatan buffer asetat pH 5,5	29
Lampiran A.4 Pembuatan larutan urea 0,2 mM	30
Lampiran A.5 Pembuatan media padat	30
Lampiran A.6 Pembuatan media cair	30
Lampiran A.7 Pembuatan larutan KH_2PO_4	30
Lampiran A.8 Pembuatan larutan K_2HPO_4	31
Lampiran A.9 Pembuatan buffer fosfat pH 8	32
Lampiran A.10 Pembuatan larutan BaCl_2 2% (b/v)	33
Lampiran A.11 Pembuatan larutan HCl 0,1 M	34
Lampiran A.12 Pembuatan larutan NaOH 10% (b/v)	34
Lampiran A.13 Pembuatan reagen Biuret	34
Lampiran A.14 Pembuatan larutan BSA (Bovine Serum Albumin)	35
Lampiran A.15 Pembuatan reagen Nessler	36
Lampiran A.16 Pembuatan larutan ammonium	36
Lampiran A.17 Pembuatan larutan asam asetat 2% (v/v) dari asam asetat glasial 99,5% (v/v)	37
Lampiran A.18 Pembuatan larutan glutaraldehid 0,5% (v/v)	37
Lampiran A.19 Pembuatan larutan kitosan	38
Lampiran A.20 Pembuatan larutan urea 50 ppm	38
Lampiran A.21 Pembuatan larutan uji urea	38
Lampiran B. Prosedur Isolasi Enzim Urease	40
Lampiran B.1 Peremajaan kultur <i>Schizosaccharomyces pombe</i>	40
Lampiran B.2 Pembuatan inoculum (biakan aktif)	40
Lampiran B.3 Isolasi urease dari <i>Schizosaccharomyces pombe</i>	40
Lampiran B.4 Pemurnian ekstrak kasar urease	40
Lampiran B.5 Penentuan kadar protein enzim	41
Lampiran B.6 Uji aktivitas enzim	42
Lampiran C. Data Hasil Penelitian	43
Lampiran C.1 Data pengukuran serapan menggunakan spektrofotometer UV-Vis untuk penentuan	43

kadar protein urease	
Lampiran C.2 Data pengukuran serapan untuk penentuan aktivitas enzim	44
Lampiran C.3 Data perhitungan pengaruh massa urease	47
Lampiran C.4 Data pengukuran daya hantar urea menggunakan biosensor konduktometri pengaruh massa urease	48
Lampiran C.5 Data pengukuran daya hantar urea untuk penentuan batas deteksi biosensor konduktometri urea	50
Lampiran C.6 Perhitungan teoritis produk hidrolisis urea oleh urease	53
Lampiran C.7 Perhitungan teoritis pH garam dari hasil hidrolisis urea NH_4HCO_3	57
Lampiran C.8 Perhitungan teoritis kemampuan urease menghidrolisis urea	57

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Biosensor merupakan suatu alat ukur yang menggabungkan komponen biologis dengan transduser sehingga menghasilkan sinyal yang diubah oleh detektor menjadi informasi secara tepat, cepat, dan kuantitatif [1,2]. Komponen utama biosensor adalah bioaktif, transduser, dan detektor. Salah satu bioaktif adalah enzim. Enzim berfungsi untuk mempercepat reaksi secara spesifik dengan mengubah molekul kompleks menjadi molekul penyusun yang dapat berbentuk ion dalam air. Reaksi enzim dipengaruhi oleh aktivitas katalitik dan konsentrasi enzim [3]. Hasil katalisis enzim akan diubah oleh transduser menghasilkan sinyal yang dapat terdeteksi oleh detektor menghasilkan data [2]. Transduser elektrokimia terdiri dari potensiometri, amperometri, dan konduktometri. Konduktometri merupakan metode pengukuran yang didasarkan pada mobilitas ion dalam larutan karena medan listrik [4, 5]. Pada penentuan urea dikatalisis urease menghasilkan amonia (NH_3) dan karbondioksida (CO_2) yang dapat membentuk ion dalam air, sehingga dapat dideteksi secara konduktometri [6]. Dengan demikian, pada penelitian ini dikembangkan biosensor urea konduktometri dengan mempelajari pengaruh massa urease.

Urea merupakan hasil samping penguraian protein dan komponen utama nitrogen dari urin yang diproduksi di hati dan disaring oleh ginjal. Konsentrasi *Blood Urea Nitrogen* (BUN) serum normal dalam tubuh yaitu 5 sampai 20 mg/dL atau 10,7 sampai 42,8 mg/dL urea, sehingga diperlukan suatu alat ukur yang selektif, cepat, dan akurat untuk mendeteksi kadar urea [7]. Maka pada penelitian ini dikembangkan metode pengukuran dengan design lebih sederhana, selektif, cepat, dan akurat yaitu biosensor urea.

Beberapa biosensor urea elektrokimia telah dikembangkan oleh para peneliti antara lain biosensor urea potensiometri. Biosensor ini menggunakan urease yang diamobilkan dalam kitosan pada elektroda selektif ion H^+ sebagai transduser. Kinerja biosensor dihasilkan pada pH 7,3 dengan tebal membran 0,2 mm, dan 35 mg urease dalam buffer fosfat pH 8 [8]. Perkembangan lebih lanjut tentang biosensor potensiometri menggunakan urease yang

diamobilkan dalam matriks komposit polivinil alkohol-poliakrilamida (PVA-PAA). Pengukuran urea dilakukan menggunakan elektroda selektif ion amonium dalam buffer fosfat dan biosensor ini telah diaplikasikan dalam sampel serum darah [9]. Biosensor potensiometri untuk penentuan urea menggunakan elektroda selektif ion H^+ telah diaplikasikan dalam serum darah dan hemodialisat dengan membandingkan urease dari *Escherichia coli* dan *Canavalia ensiformis*. Biosensor ini memiliki kinerja terbaik menggunakan urease dari *Canavalia ensiformis*-Jack Bean yang diamobilkan secara penjejakan dalam fotopolimer PVA/SbQ menggunakan buffer fosfat pH 7,4 [10]. Pada perkembangan biosensor potensiometri membutuhkan elektroda yang selektif untuk satu jenis ion, maka biosensor ini memiliki sensitivitas yang rendah. Para peneliti telah mengembangkan biosensor urea konduktometri untuk meningkatkan kinerja biosensor yaitu untuk penentuan urea menggunakan urease yang diamobilkan dalam sol-gel menggunakan prekursor tetrametil ortosilikat pada elektroda *screen-printed interdigitated array* (IDA). Biosensor ini menggunakan buffer imidazole-HCl pada pH 7,5 dengan batas deteksi sebesar 30 μM [11]. Perkembangan lebih lanjut tentang biosensor konduktometri yaitu menggunakan urease dari *Schizosaccharomyces pombe* diamobilkan dalam nata de coco pada SPCE. Kinerja biosensor ini ditunjukkan sensitivitas 14,81 $\mu S/ppm$ pada massa urease 1 μg , tebal membran 5 μm , dan pH larutan urea 8 dalam buffer fosfat 0,01 M [6]. Berdasarkan perkembangan biosensor urea konduktometri yang dijelaskan di atas sudah baik, namun untuk meningkatkan sensitivitas biosensor maka diperlukan pengembangan biosensor mengganti nata de coco dengan kitosan. Pemilihan kitosan disebabkan dapat mengatur ukuran pori kitosan pada penambahan jumlah glutaraldehid sebagai agen *cross-linker* [12]. Maka pada penelitian ini dilakukan modifikasi SPCE dengan urease dalam kitosan yang diukur menggunakan transduser konduktometri.

Prinsip kerja biosensor penentuan urea berdasarkan reaksi hidrolisis urea dengan katalis urease menjadi amonia (NH_3) dan karbondioksida (CO_2). Amonia dalam air terurai menjadi ion amonium (NH_4^+) dan ion hidroksil (OH^-), sedangkan karbondioksida dalam air terurai menjadi ion hidrogen karbonat (HCO_3^-) dan ion hidronium (H^+) [8,9]. Mobilitas ion dalam larutan karena medan listrik menyebabkan ion-ion elektrolit bermigrasi menuju kedua elektroda pada kutub yang berlawanan (ion bermuatan negatif

bergerak ke anoda, ion bermuatan positif bergerak ke katoda), dan menghasilkan konduktivitas larutan yang terbaca [5].

Faktor yang mempengaruhi kinerja biosensor yaitu massa enzim. Secara teori, reaksi enzimatik menjelaskan jumlah enzim berbanding lurus dengan laju reaksi [13]. Pada penelitian ini urease yang digunakan diamobilkan dalam membran sehingga meningkatkan jumlah hasil reaksi. Hasil reaksi tersebut berupa ion-ion yang diubah oleh transduser menjadi sinyal elektrik dan diperkuat oleh penguat daya (*amplifier*) dan menghasilkan data yang terdeteksi oleh detektor berupa daya hantar larutan urea [2]. Hasil penelitian (Kuralay, dkk, 2005) menjelaskan pada penentuan urea menggunakan urease bahwa konsentrasi urease mempengaruhi potensial urea yang terukur dan dihasilkan konsentrasi urease optimum pada 0,025 mg protein/mL [14]. Oleh karena itu, pada penelitian ini dipelajari pengaruh massa urease dari *Schizosaccharomyces pombe* dan diharapkan jumlah enzim dapat meningkatkan jumlah hasil reaksi, sehingga meningkatkan kepekaan biosensor.

1.2 Rumusan Masalah

1. Bagaimana pengaruh massa enzim urease teramobil terhadap kinerja biosensor konduktometri dalam mendeteksi urea
2. Bagaimana karakter kinerja biosensor konduktometri urea yang dimodifikasi

1.3 Batasan Masalah

1. Membran yang digunakan adalah kitosan dengan tebal membran 0,03 mm
2. Metode amobilisasi yang digunakan adalah adsorpsi dan ikatan silang
3. Luas elektroda yang digunakan adalah $1 \times 5 \text{ mm}^2$
4. Enzim yang digunakan adalah urease hasil isolasi dari bakteri *Schizosaccharomyces pombe*
5. pH larutan uji yang digunakan adalah 8

1.4 Tujuan Penelitian

1. Mempelajari dan menentukan pengaruh massa enzim urease teramobil terhadap kinerja biosensor
2. Menentukan karakter kinerja biosensor konduktometri urea yang dimodifikasi

1.5 Manfaat Penelitian

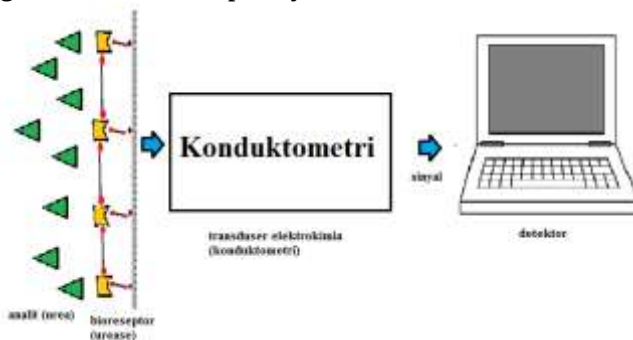
Hasil dari penelitian ini dapat digunakan sebagai pengetahuan atau referensi dalam pengembangan biosensor untuk mendeteksi urea

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Biosensor

Biosensor merupakan suatu alat ukur yang menggabungkan komponen biologis dengan transduser sehingga menghasilkan sinyal yang diubah oleh detektor menjadi informasi secara tepat, cepat, dan kuantitatif [1,2]. Komponen utama biosensor adalah bioaktif, transduser, dan detektor. Salah satu bioaktif adalah enzim. Enzim berfungsi untuk mempercepat reaksi secara spesifik dengan mengubah molekul kompleks menjadi molekul penyusun yang dapat berbentuk ion dalam air [4]. Hasil katalisis enzim diubah oleh transduser menghasilkan sinyal dan terdeteksi oleh detektor menghasilkan data berupa daya hantar [2].



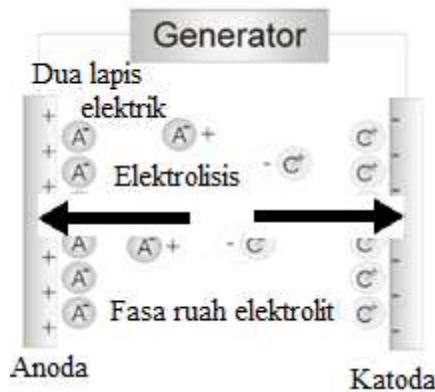
Gambar 2.1 Komponen penyusun biosensor

Gambar 2.1 menjelaskan bahwa biosensor spesifik mendeteksi molekul kompleks sesuai bioaktif yang digunakan. Hasil interaksi tersebut diubah oleh transduser menjadi sinyal elektrik, diperkuat oleh penguat daya (*amplifier*), dan menghasilkan data yang terdeteksi oleh detektor [2].

2.2 Transduser Konduktometri

Konduktometri merupakan metode pengukuran daya hantar yang didasarkan pada mobilitas ion dalam larutan karena medan listrik. Hal ini menyebabkan ion-ion elektrolit bermigrasi menuju

kedua elektroda pada kutub yang berlawanan (ion bermuatan negatif bergerak ke anoda, ion bermuatan positif bergerak ke katoda), dan menghasilkan daya hantar larutan yang terukur [5].



Gambar 2.2 Migrasi ion dalam larutan dan konduktivitas elektrolit [5]

Pada Gambar 2.2 di atas dihasilkan konduktivitas larutan dari kontribusi semua ion-ion elektrolit dalam larutan yang bermigrasi menuju kedua elektroda pada kutub yang berlawanan sehingga mampu menghantarkan arus listrik [5]. Penentuan daya hantar larutan elektrolit dapat ditunjukkan pada persamaan sebagai berikut [3]:

$$G = \frac{1}{R} = k \frac{A}{d} \quad (2.1)$$

Keterangan:

G = daya hantar larutan (Ohm^{-1}) atau (S)

R = tahanan (Ohm)

k = konduktivitas (S)

A = luas permukaan elektroda (cm^2)

d = jarak antar elektroda (cm)

Disebabkan konduktivitas larutan bergantung pada konsentrasi larutan sehingga untuk menentukan konduktivitas larutan secara kuantitatif dinyatakan sebagai konduktivitas molar sebagai berikut [3]:

$$\Lambda = \frac{k}{C} \quad (2.2)$$

Keterangan:

Λ = konduktivitas molar ($\text{S}\cdot\text{cm}^2/\text{mol}$)

C = konsentrasi molar ($\text{mol}\cdot\text{cm}^{-3}$)

Substitusi persamaan 2.2 ke persamaan 2.1 menjadi persamaan daya hantar secara umum dengan persamaan sebagai berikut [3]:

$$G = \frac{\sum \lambda_i C_i}{1000K} \quad (2.3)$$

Keterangan :

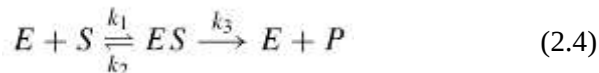
G = daya hantar (Ohm^{-1}) / (S)

λ_i = daya hantar molar ion ($\text{S mol}\cdot\text{cm}^{-3}$)

K = tetapan sel daya hantar (cm^{-1})

2.3 Laju Reaksi Enzimatis

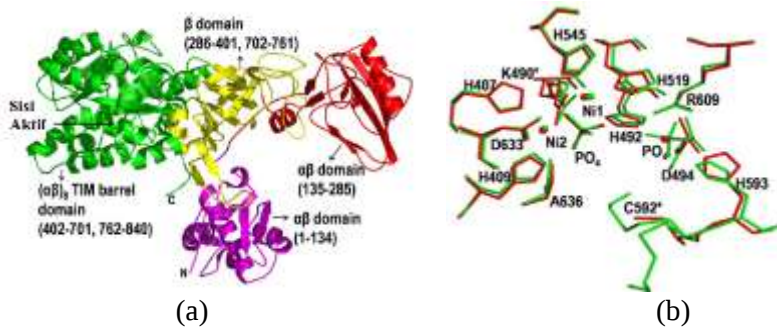
Enzim merupakan protein terdiri dari beberapa gugus polipeptida yang mengkatalisis reaksi secara spesifik [3, 15]. Enzim diperoleh kembali setelah produk dihasilkan. Cara kerja enzim adalah molekul substrat menempel pada sisi aktif enzim, kemudian mempercepat proses reaksi dengan menurunkan energi aktivasi pembentukan kompleks enzim substrat, dan produk dihasilkan [3]. Mekanisme dasar reaksi enzimatis ditunjukkan sebagai berikut [16]:



Aktivitas katalitik enzim menjadi parameter penting dalam pembuatan biosensor. Aktivitas katalitik enzim dapat bekerja optimum pada kondisi tertentu, suhu, pH, aktivator, inhibitor, konsentrasi enzim, dan konsentrasi substrat [3]. Biosensor urea dikatalisis urease yang bekerja spesifik terhadap urea. Pada reaksi enzimatis, urea akan menghasilkan ion hydronium (H^+), ion hidrogen karbonat (HCO_3^-), ion ammonium (NH_4^+), dan ion hidroksil (OH^-) yang dapat mengubah konduktivitas dalam larutan. Hal ini menyebabkan kadar urea dapat diukur menggunakan biosensor konduktometri [6, 8, 9, 11]. Urease memiliki karakteristik yang ditunjukkan Tabel 2.1 dan struktur molekul ditampilkan Gambar 2.3.

Tabel 2.1 Karakteristik urease dari *Schizosaccharomyces pombe* dan *Canavalia ensiformis* (Jack Bean)

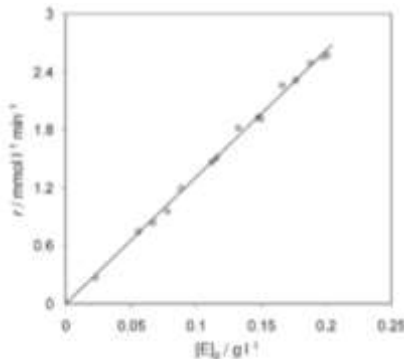
Karakteristik	Urease dari <i>Schizosaccharomyces pombe</i>	Referensi	Urease dari <i>Canavalia ensiformis</i> (Jack Bean)	Referensi
Titik isoelektrik	-	-	5,0-5,2	[20]
pH optimum	8	[18]	7,4	[20]
K _M	0,2065 mM (dalam fosfat)	[18]	1,3 mM (dalam tris HCl)	[20]
Terdenaturasi	-	-	Di atas 45 °C selama 60 menit	[20]
Inhibitor	-	-	Fosfor amida	[20]
Berat molekul	212 kDa	[19]	480kDa	[20]



Gambar 2.3 (a) Struktur molekul urease dari Jack Bean Meal, (b) Stereo diagram sisi aktif urase [21]

Gambar 2.3 menjelaskan bahwa molekul urease memiliki struktur kristal heksagonal asimetris atau molekul Jack Bean Urease juga disebut memiliki molekul bentuk-T yang memiliki 840 residu asam amino. Pada Gambar 2.3 (b) menjelaskan bahwa sisi aktif urease dari Jack Bean berisi bi-Nikel dan Tabel 2.1 menjelaskan molekul fosfat cocok dengan sisi aktif enzim sehingga bersifat inhibitor dalam konsentrasi yang tinggi yaitu 1,6 M [21].

Penggunaan enzim pada biosensor harus memperhatikan aspek amobilisasi enzim. Hal ini disebabkan enzim dalam keadaan bebas akan mengalami perubahan secara kimia dan fisika sehingga membuat enzim mudah rusak. Amobilisasi enzim merupakan proses pengikatan enzim ke media amobilisasi secara kimia atau fisika. Tujuan dari amobilisasi enzim adalah menjaga aktivitas katalitik enzim, stabilitas enzim, dan waktu pemakaian biosensor. Selain itu amobilisasi enzim juga dapat mengurangi waktu respon enzim terhadap substrat serta praktis dalam penyimpanannya. Amobilisasi enzim berpengaruh terhadap aktivitas urease yang menghidrolisis urea pada setiap unit enzim, sehingga peningkatan konsentrasi enzim mempengaruhi aktivitas enzim [3].



Gambar 2.4 Laju hidrolisis urea oleh urease dari *Canavalia ensiformis* pada 25 °C dan pH 7 [22]

Gambar 2.4 menunjukkan massa urease (enzim bebas) dari *Canavalia ensiformis* pada konsentrasi substrat tetap berbanding lurus dengan kecepatan reaksi [22]. Urease dari *Schizosaccharomyces pombe* pada kondisi bebas memiliki $V_{maks}=0,4046 \mu\text{mol}/\text{menit}$ dan $K_M=0,2065 \text{ mM}$ pada pH 8 [18]. Karakteristik enzim sesuai Michaelis-Menten yaitu memiliki harga K_M dan V_{maks} . K_M merupakan konsentrasi substrat saat enzim mencapai setengah kecepatan maksimum, dan V_{maks} merupakan kecepatan maksimum dari aktivitas enzim untuk menghasilkan produk yang optimal. Persamaan laju reaksi ditunjukkan sesuai persamaan Michaelis-Menten sebagai berikut ini [15]:

$$V = \frac{V_{\text{maks}} \times [S]}{K_M + [S]} \quad (2.5)$$

$$V = k_2[ES] \quad (2.6)$$

$$V_{\text{maks}} = k_3[E] \quad (2.7)$$

Keterangan:

K_M = tetapan Michaelis-Menten (mol/L)

$[S]$ = konsentrasi substrat (mol/L)

$[E]$ = konsentrasi enzim (mol/L)

V = laju reaksi (μmol/menit)

V_{maks} = kecepatan reaksi maksimum (μmol/menit)

Tabel 2.2 Kondisi optimum enzimatis untuk amobilisasi urease pada berbagai media amobilisasi

enzim urease teramobil pada	konsentrasi urease optimum (mg/mL)	jumlah urease terjebak (mg/g substrat)	aktivitas (unit)	konsentrasi substrat optimum (%)	referensi
Kitosan-Ca-alginat	2,520	2,520	0,55	3% Na-alginat	[23]
Kitosan-polietilen glikol	2,520	2,36	0,53	3%	[24]
Kitosan-natrium tripolifosfat	2,520	2,340	0,57	2,5%	[25]

2.4 Metode Amobilisasi

Amobilisasi enzim merupakan proses pengikatan enzim ke media amobilisasi secara kimia atau fisika. Tujuan dari amobilisasi enzim adalah untuk menjaga aktivitas katalitik enzim, stabilitas enzim dan waktu pemakaian biosensor. Pengamobilan enzim dilakukan, karena enzim dalam keadaan bebas akan mengalami

perubahan secara kimia dan fisika sehingga dapat membuat enzim bersifat destruktif. Metode amobilisasi enzim dapat digolongkan menjadi beberapa cara yaitu: a) adsorpsi; b) interaksi ionik; c) ikatan kovalen; d) ikatan silang; e) penjebakan; dan f) mikrokapsul [3, 26].

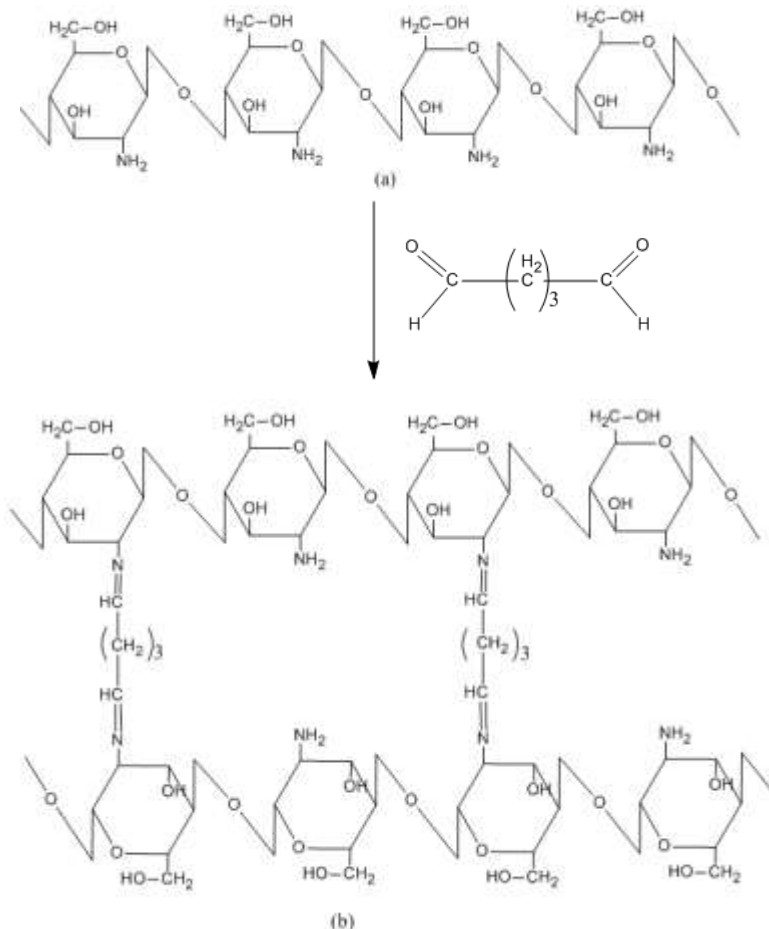
Metode amobilisasi adsorpsi didasarkan keterikatan enzim non-kovalen. Metode ini mudah dilakukan, memiliki efek perubahan konformasi enzim kecil, dan mudah meregenerasi enzim yang tidak aktif. Kelemahan metode ini memiliki life time 24 jam. Metode amobilisasi interaksi ionik, ikatan kovalen, ikatan silang, penjebakan, dan mikrokapsul memiliki *life time* yang lebih lama, tetapi dapat menurunkan aktivitas enzim karena perubahan konformasi enzim (ikatan kovalen dan ikatan silang), pada ikatan silang mengurangi lisis enzim yang teramobilkan karena ikatan yang terbentuk antara enzim dengan material pendukung sangat kuat. Pada ikatan ionik terdapat keberadaan ion-ion lain dan perubahan pH larutan, serta mikrokapsul dibutuhkan konsentrasi enzim besar untuk menghindari enzim non-aktif [3, 27].

2.5 Kitosan sebagai Media Amobilisasi

Media amobilisasi enzim merupakan tempat terikatnya enzim yang diamobilkan pada suatu media [19]. Media yang dapat digunakan amobilisasi enzim antara lain: kitosan-glutaraldehyd, nata de coco, kitosan-Ca-Alginat, dan kitosan-Natrium tripolifosfat [8, 9, 23, 25]. Kitosan merupakan polimer deasitilasi N-asetil glukosamin dari deasitilasi kitin dalam kondisi alkali. Kitosan merupakan polimer alam dari monomer glukosamin dengan ikatan (1,4) β -glikosidik yang dapat larut dalam asam asetat, asam sitrat, dan asam format [12]. Kitosan memiliki berat molekul yang tinggi sehingga diketahui memiliki viskositas yang baik dalam asam, strukturnya dapat menahan air, dan dapat membentuk gel pada pH < 6 yang disebabkan kitosan memiliki sifat polielektrolit kationik [12, 28].

Kitosan memiliki gugus hidroksil dan amin yang dapat membentuk jembatan hidrogen secara intermolekuler atau intramolekuler, sehingga dapat membentuk ikatan hidrogen yang kuat dan membuat kitosan tidak larut dalam air [28]. Media amobilisasi yang baik digunakan memiliki sifat-sifat nontoksik, biokompatibel, *biodegradable*, hidrofilik, sifat anti bakteri, dan memiliki afinitas yang besar terhadap enzim, serta kitosan sebagai

media amobilisasi dapat berikatan silang dengan kuat (*crosslinking*) menggunakan glutaraldehid yaitu antara gugus amin dari kitosan dengan gugus aldehyd dari glutaraldehid ditunjukkan pada Gambar 2.5 [12].



Gambar 2.5 Mekanisme reaksi ikatan silang kitosan dengan glutaraldehid, (a) struktur kitosan, (b) ikatan silang kitosan-glutaraldehid [12]

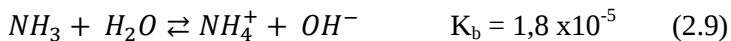
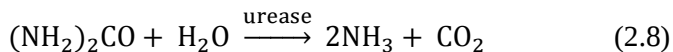
Kinerja biosensor urea optimum adalah pada pH basa, sehingga kitosan tidak terlarut dan enzim lebih kuat terikat dalam kitosan [29]. Modifikasi kitosan secara kimia dengan glutaraldehid

dapat membuat kitosan bersifat hidrofobik dan mengurangi tingkat *swelling* saat digunakan [29, 30], maka pada penelitian ini digunakan kitosan sebagai media amobilisasi.

2.6 Biosensor Konduktometri Urea

Urea merupakan senyawa organik yang tersebar luas pada spesies hidup karena dapat mensintesis urea, namun mikroorganisme juga dapat menghidrolisis urea menjadi amonia dan karbondioksida dengan bantuan urease [10]. Selain itu, urea merupakan hasil samping degradasi protein dan komponen utama nitrogen dari urin yang diproduksi di hati dan disaring oleh ginjal [7]. Metode kimiawi untuk menentukan urea pada umumnya menggunakan metode ezimatik yang memanfaatkan urease, yaitu enzim spesifik untuk urea [6, 8, 9]. Metode enzimatik ini telah diaplikasikan pada biosensor potensiometri, konduktometri, dan amperometri [6, 10, 31].

Biosensor konduktometri urea didasarkan pada reaksi hidrolisis urea oleh urease menghasilkan ion-ion sesuai persamaan reaksi dibawah ini [6, 8, 10]:



Ion-ion sesuai persamaan reaksi di atas bermigrasi menuju elektroda pada kutub yang berlawanan melalui membran dan menghasilkan daya hantar larutan yang terukur oleh konduktometer sebagai daya hantar akibat adanya perubahan konsentrasi ion-ion hasil hirolisis dalam larutan urea [5]. Maka daya hantar yang terukur merupakan hasil dari persamaan matematis sebagai berikut [3]:

$$G = \frac{(\lambda_{NH_4^+} + C_{NH_4^+}) + (\lambda_{OH^-} - C_{OH^-}) + (\lambda_{HCO_3^-} - C_{HCO_3^-}) + (\lambda_{H^+} + C_{H^+})}{1000 \text{ K}} \quad (2.11)$$

Tabel 2.3 Daya hantar molar ion pada hidrolisis urea oleh urease [3]

Ion	Daya hantar molar ion (λ_i) (S-cm²/mol)
H ⁺	349,6
OH ⁻	199,1
NH ₄ ⁺	73,5
HCO ₃ ⁻	44,5

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Kimia Analitik, Biokimia, dan Kimia Instrumen Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Brawijaya Malang. Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Oktober hingga Desember 2015.

3.2 Alat dan Bahan Penelitian

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain pH meter (merek *Senz pH tester*), neraca analitik (merek *Mettler Toledo* tipe AL 204), pengaduk magnetik Ikamag RH, pipet mikro (*accumax pro*), *refrigerator*, oven (*Memmert*), *microplate*, konduktometer, *Screen Printed Carbon Electrode* (SPCE) dengan luas $1 \times 5 \text{ mm}^2$, dan peralatan gelas.

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah urease hasil isolasi dari *Schizosaccharomyces pombe* dengan aktivitas spesifik 0,075 U/mg dan konsentrasi protein urease 12296 mg/L, asam asetat glasial (*Merck*), kitosan, larutan glutaraldehid 25%, urea (p.a), dan akuades (hidrobat).

3.3 Tahapan Penelitian

Penelitian ini dilakukan melalui beberapa tahap kegiatan, antara lain:

1. Pembuatan biosensor konduktometri urea
2. Pengaruh massa urease
3. Karakterisasi biosensor
4. Pengolahan Data
 - a. Penentuan sensitivitas biosensor
 - b. Penentuan batas deteksi biosensor

3.4 Cara Kerja

3.4.1 Pembuatan Biosensor Konduktometri Urea

Larutan kitosan dipipet sebanyak 5 μL , secara bertahap dilapiskan pada *Screen Printed Carbon Electrode* (SPCE) (dua kali pelapisan) dan dikeringkan pada temperatur 50 $^{\circ}\text{C}$ selama 5 menit. Selanjutnya ditambahkan glutaraldehid 0,5 % sebanyak 10 μL .

3.4.2 Pengaruh Massa Urease

Pengaruh massa urease terhadap kinerja biosensor konduktometri urea ditentukan dengan mengatur massa urease yang diamobilkan dalam kitosan. Pengaruh massa urease yang ditambahkan dalam kitosan-glutaraldehid adalah 5; 10; 15; 25; 35; 45; 50; dan 55 μL atau setara dengan 0,06; 0,12; 0,18; 0,31; 0,43; 0,55; 0,61; 0,68 mg, lalu dikeringkan dalam *refrigerator* selama 24 jam. Kemudian daya hantar larutan urea diukur menggunakan konduktometer dengan posisi SPCE saling berhadapan. SPCE yang tidak dilapisi membran dan enzim dihubungkan ke kutub positif, dan SPCE yang dilapisi kitosan dengan berbagai massa urease dihubungkan ke kutub negatif. Pengukuran dilakukan dengan mencelupkan kedua elektroda ke dalam 300 μL larutan urea pada kisaran konsentrasi 0; 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; dan 0,5 ppm.

3.4.3 Karakterisasi Biosensor

Berdasarkan hasil penelitian 3.4.2 dihasilkan massa urease optimum pada 0,18 mg. Maka dibuat elektroda baru sesuai Cara Kerja 3.4.1, setelah itu ditambahkan 15 μL atau 0,18 mg urease, dan dikeringkan dalam *refrigerator* selama 24 jam. Kemudian daya hantar larutan urea diukur menggunakan konduktometer dengan posisi SPCE saling berhadapan. SPCE yang tidak dilapisi kitosan dan enzim dihubungkan ke kutub positif, dan SPCE yang dilapisi kitosan dan urease dihubungkan ke kutub negatif. Pengukuran dilakukan dengan mencelupkan kedua elektroda ke dalam 300 μL larutan urea pada kisaran konsentrasi 0; 0,05; 0,1; 0,15; dan 0,2 ppm. Hasil pengukuran daya hantar larutan urea dibuat kurva hubungan

konsentrasi urea terhadap daya hantar urea untuk menentukan kinerja biosensor terdiri dari sensitivitas, batas deteksi, dan kisaran konsentrasi urea linier.

3.5 Pengolahan Data

a. Penentuan sensitivitas biosensor

Sensitivitas biosensor ditentukan dari kurva hubungan antara konsentrasi urea terhadap daya hantar. Dari kurva tersebut dihasilkan persamaan regresi linier $G = aC + b$. Sensitivitas biosensor ditunjukkan oleh kemiringan garis kurva di atas.

b. Penentuan batas deteksi biosensor

Batas deteksi ditentukan dari kurva hubungan antara daya hantar larutan terhadap konsentrasi larutan uji urea. Dari kurva tersebut dihasilkan persamaan regresi linier $G = aC + b$. Lalu dihitung standar deviasi dari pengukuran blanko sebanyak 20 ulangan pengukuran dan rata-rata daya hantar hasil pengukuran. Kemudian dimasukkan ke dalam persamaan dibawah ini, sehingga dapat diketahui batas deteksi dari biosensor.

$$y - \hat{y}_B = 3S_B \quad (3.1)$$

$$y = 3S_B + \hat{y}_B \quad (3.2)$$

$$ax + b = 3S_B + \hat{y}_B \quad (3.3)$$

$$x \text{ atau LOD} = \frac{3S_B + (\hat{y}_B - b)}{a} \quad (3.4)$$

Keterangan:

S_B = standar deviasi blanko

$\hat{y}_B$ = konduktivitas rata-rata blanko

a dan b merupakan persamaan garis untuk hasil karakterisasi

G = daya hantar urea

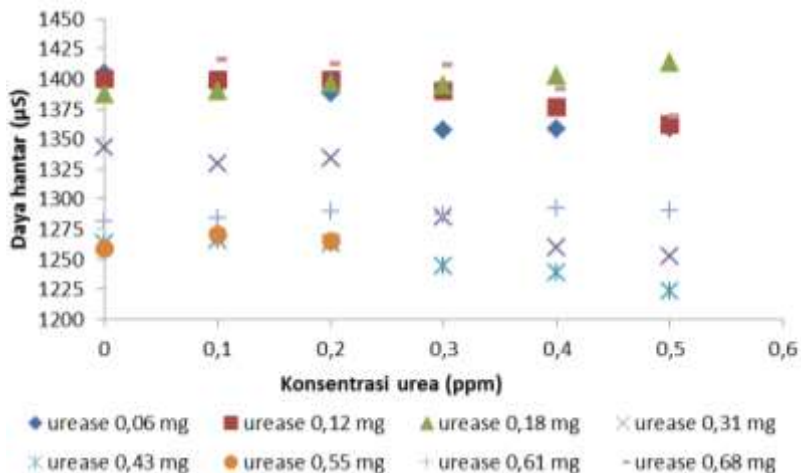
C = konsentrasi urea

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Pengaruh Massa Urease terhadap Kinerja Biosensor Konduktometri Urea

Pengukuran daya hantar urea hasil penelitian dari 3.4.2 ditampilkan pada Gambar 4.1. Pada massa urease 0,06 mg; 0,12 mg; dan 0,18 mg terdapat hubungan yang linier dengan peningkatan sensitivitas biosensor ditampilkan pada Tabel 4.1. Sedangkan, pada massa urease 0,31 mg; 0,43 mg; 0,55 mg; 0,61 mg; dan 0,68 mg tidak memiliki hubungan yang linier dengan sensitivitas biosensor. Berdasarkan teori Gambar 2.4 menjelaskan bahwa laju reaksi enzimatis berbanding lurus dengan jumlah enzim [22], sehingga massa enzim dapat mempengaruhi sensitivitas biosensor. Pada massa urease 0,31 mg; 0,43 mg; 0,55 mg; 0,61; dan 0,68 mg terjadi ketidaksesuaian dengan teori dimungkinkan oleh beberapa hal yang akan dijelaskan lebih lanjut.



Gambar 4.1 Hubungan antara daya hantar urea terhadap konsentrasi larutan urea 0 hingga 0,5 ppm

Peningkatan daya hantar yang terbaca merupakan hasil dari hidrolisis urea menjadi amonia (NH_3) dan karbondioksida (CO_2)

yang terurai dalam air menjadi ion amonium (NH_4^+), ion hidroksil (OH^-), ion hidrogen karbonat (HCO_3^-), dan ion hidronium (H^+). Ion-ion tersebut dihasilkan pada permukaan luar elektroda kerja (mengandung urease) yang dihubungkan ke kutub negatif. Ion hasil hidrolisis urea berdifusi ke permukaan dalam elektroda kerja melalui membran dan tertarik ke kutub negatif adalah ion yang bermuatan positif yaitu ion amonium (NH_4^+) dan ion hidronium (H^+). Sedangkan ion hidroksil (OH^-), dan ion hidrogen karbonat (HCO_3^-) tertarik ke kutub positif. Ion-ion tersebut bermigrasi menuju kedua kutub (positif dan negatif) elektroda karbon (SPCE) dipengaruhi oleh medan listrik [5]. Mobilitas ion hidronium (H^+) lebih besar dibandingkan ion yang lain, hal ini disebabkan ion hidronium memiliki daya hantar molar terbesar ditunjukkan Tabel 2.3. Oleh karena itu, perubahan daya hantar urea yang terbaca lebih besar diakibatkan ion hidronium (H^+). Tetapi, penguraian hasil hidrolisis urea dipengaruhi oleh pH. Secara teoritis ditampilkan Lampiran C.6, pada pH 8, didalam air mengandung $[\text{OH}^-] > [\text{H}^+]$. Hasil penguraian amonia dan karbondioksida dari urea secara teoritis juga dihasilkan $[\text{OH}^-] > [\text{H}^+]$. Oleh karena itu, ion hidronium (H^+) akan ternetralkan oleh ion hidroksil (OH^-) membentuk H_2O , dan terdapat konsentrasi ion hidroksil (OH^-) sisa. Selain itu, secara teoritis ditampilkan pada Lampiran C.7, pada pH 8 ion amonium (NH_4^+) dan ion hidrogen karbonat (HCO_3^-) dimungkinkan membentuk molekul NH_4HCO_3 . Hal ini mengakibatkan perubahan daya hantar hanya disebabkan oleh ion hidroksil (OH^-) sisa, sehingga sensitivitas biosensor menjadi kecil.

Berdasarkan tahap penelitian 3.4.1, untuk membentuk ikatan silang pada kitosan ditambahkan glutaraldehid 0,5%, secara teori ditunjukkan pada Gambar 2.5. Penambahan glutaraldehid dengan perbandingan volume 1:2 (kitosan:glutaraldehid) dimungkinkan ukuran pori yang terbentuk pada kitosan lebih kecil dan tidak seragam sehingga tidak sesuai dengan ukuran urease. Ukuran pori yang tidak seragam mengakibatkan jumlah urease yang teramobilisasi menjadi terbatas, yaitu terdapat adsorpsi di permukaan dan adsorpsi di dalam (diantara *network*). Oleh karena itu, peningkatan massa urease pada kitosan 0,06 mg hingga 0,68 mg dapat dimungkinkan urease mudah lepas dari media amobilisasi ketika digunakan untuk pengukuran, sehingga reaksi enzimatik urea oleh urease di permukaan elektroda menjadi sedikit dan hasil reaksi tidak sesuai dengan konsentrasi urea yang terdapat dalam larutan.

Selain itu, peningkatan massa urease yang ditambahkan dalam kitosan dimungkinkan dapat menutupi pori kitosan, sehingga difusi substrat sulit untuk sampai pada sisi aktif enzim yang saling menumpuk akibat jumlah enzim yang banyak [32]. Hal ini menyebabkan jumlah hasil hidrolisis urea menjadi turun dan perubahan daya hantar urea yang terbaca menjadi kecil. Oleh karena itu, sensitivitas biosensor menjadi kecil dan peningkatan massa urease tidak berbanding lurus dengan sensitivitas biosensor.

Hasil perubahan daya hantar larutan urea yang terbaca ditunjukkan pada Gambar 4.1 dan sensitivitas ditunjukkan pada Tabel 4.1. Hubungan linier konsentrasi urea dengan sensitivitas dihasilkan pada massa urease 0,06 mg; 0,12 mg; dan 0,18 mg pada konsentrasi urea 0 hingga 0,5 ppm. Massa urease menentukan kecepatan reaksi enzimatik ditunjukkan pada Gambar 2.4, sehingga menentukan jumlah ion hasil hidrolisis urea. Perubahan daya hantar urea yang terbaca ditentukan berdasarkan jumlah urea yang dapat terhidrolisis oleh urease. Sehingga massa urease menentukan kinerja biosensor ditunjukkan dari sensitivitas biosensor. Sensitivitas terbaik dihasilkan 47 $\mu\text{S/ppm}$ pada massa urease 0,18 mg. Hal ini disebabkan terdapat kesesuaian antara konsentrasi urea yang dihidrolisis dengan massa urease sehingga menghasilkan sensitivitas terbaik.

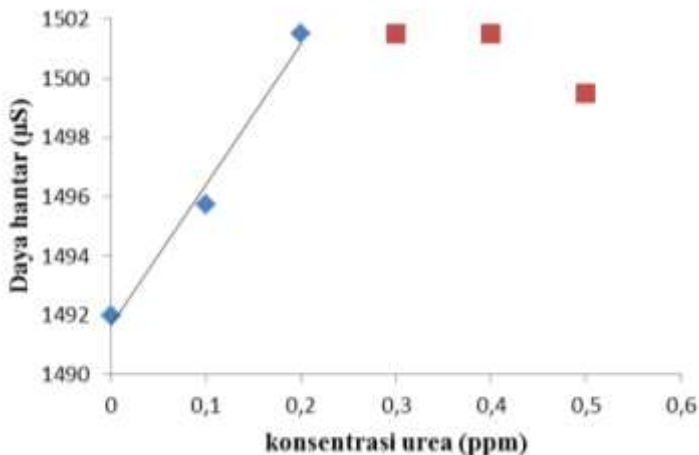
Tabel 4.1 Kinerja biosensor konduktometri urea pada berbagai massa urease dengan kisaran konsentrasi urea 0 hingga 0,5 ppm

massa urease (mg)	sensitivitas ($\mu\text{S/ppm}$)
0,06	-96
0,12	-76
0,18	47
0,31	-176
0,43	-204
0,55	-344
0,61	19
0,68	-182

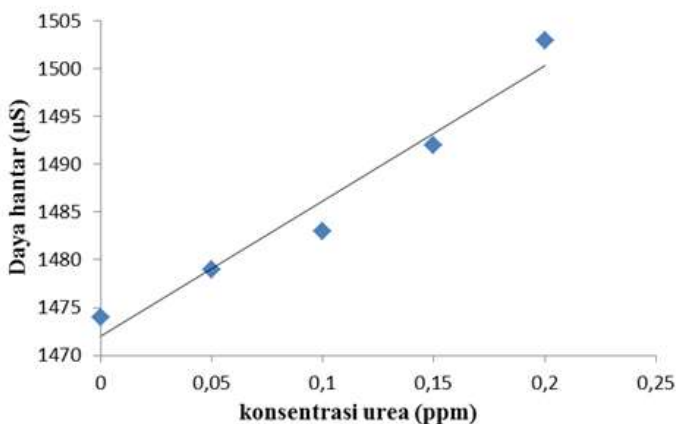
Berdasarkan hasil penelitian dan uraian di atas, maka dihasilkan massa urease optimum adalah 0,18 mg untuk luas SPCE $1 \times 5 \text{ mm}^2$, tebal membran kitosan $0,03 \text{ mm}^2$, dengan perbandingan volume 1:2 (kitosan-glutaraldehyd). Oleh karena itu, pada karakterisasi digunakan massa urease 0,18 mg.

4.2 Karakterisasi Biosensor Konduktometri Urea

Berdasarkan hasil penelitian optimasi massa urease dilakukan karakterisasi biosensor yang meliputi sensitivitas, batas deteksi, dan kisaran konsentrasi urea. Karakterisasi menggunakan massa urease optimum 0,18 mg dan dilakukan pengukuran daya hantar larutan urea 0 hingga 0,5 ppm. Hasil pengukuran daya hantar urea dibuat kurva hubungan konsentrasi urea dengan daya hantar ditunjukkan Gambar 4.2. Hasil penelitian menunjukkan konsentrasi urea linier dengan perubahan daya hantar urea yang terbaca pada konsentrasi urea 0 hingga 0,2 ppm. Oleh karena itu dibuat biosensor urea dengan memperkecil kisaran konsentrasi urea 0 hingga 0,2 ppm ditampilkan Gambar 4.3 dan memiliki persamaan matematis hubungan daya hantar dengan konsentrasi urea $G=142C + 1472$.



Gambar 4.2 Hubungan antara konsentrasi urea dengan daya hantar larutan urea 0 hingga 0,5 ppm



Gambar 4.3 Hubungan antara konsentrasi urea dengan daya hantar larutan urea 0 hingga 0,2 ppm

Tabel 4.2 Karakteristik biosensor urea konduktometri pada massa urease 0,18 mg

parameter	kinerja biosensor urea konduktometri
kisaran konsentrasi	0,05 hingga 0,2 ppm
sensitivitas	142 µS/ppm
batas deteksi	0,05 ppm

Berdasarkan persamaan matematis hubungan daya hantar dengan konsentrasi urea $G=142C + 1472$ dapat diketahui sensitivitas dan batas deteksi yang ditampilkan pada Tabel 4.2. Sensitivitas merupakan kemiringan dari persamaan kurva hubungan konsentrasi urea dengan daya hantar, sedangkan batas deteksi ditentukan dari data daya hantar blanko sebanyak 20 ulangan pengukuran blanko.

Gambar 4.3 menunjukkan kisaran konsentrasi urea linier dihasilkan pada kisaran konsentrasi urea yang masih rendah. Hal ini terjadi karena urease tidak berfungsi secara maksimal yang disebabkan urease tidak teramobilkan dengan baik dalam membran kitosan. Oleh karena itu, perlu dipelajari perbandingan kitosan dengan jumlah glutaraldehid sebagai pereaksi pengikat silang.

Berdasarkan hasil karakterisasi dan uraian di atas, maka dihasilkan pada massa urease 0,18 mg untuk luas SPCE $1 \times 5 \text{ mm}^2$, tebal membran kitosan $0,03 \text{ mm}^2$, dengan perbandingan volume 1:2

(kitosan-glutaraldehyd) dihasilkan sensitivitas 142 $\mu\text{S/ppm}$, batas deteksi 0,05 ppm, dan kisaran konsentrasi urea 0 hingga 0,2 ppm.

BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan, dapat diambil kesimpulan sebagai berikut

1. Kinerja biosensor konduktometri urea berbasis SPCE (*Screen Printed Carbon Electrode*)-Kitosan dipengaruhi oleh massa urease. Kinerja biosensor maksimum dihasilkan pada massa urease 0,18 mg, membran kitosan dengan ketebalan 0,03 mm, dan SPCE dengan ukuran 1 x 5 mm².
2. Pada massa urease optimum, kinerja biosensor ditunjukkan sensitivitas 142 $\mu\text{S/ppm}$, batas deteksi 0,05 ppm, pada kisaran konsentrasi urea 0,05 hingga 0,2 ppm.

5.2 Saran

Untuk meningkatkan kinerja biosensor urea konduktometri perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mempelajari perbandingan kitosan dengan pereaksi glutaraldehid sebagai *cross-linker*.

DAFTAR PUSTAKA

- [1] Khairi, 2003, **Pembuatan Biosensor Urea dengan Transduser Tembaga**, *Jurnal Sains Kimia*, 7, 2, 40-43
- [2] Masdor, N. A., 2013, **Inovasi dan Perkembangan Teknologi Biosensor dan Biodiagnostik**, *Buletin Teknologi Mardi*, 4, 79-86
- [3] Mulyasuryani, A., 2014, **Elektroanalitik Dasar dan Aplikasi Edisi Revisi**, Deepublish, Yogyakarta
- [4] Wahab, A. W. dan N. L. Nafie, 2014, **Metode Pemisahan dan Pengukuran 2 (Elektrometri dan Spektrofotometri, Laporan Hibah Penulisan Buku Ajar**, Universitas Hasanuddin, 53-87
- [5] Renault, N. J. dan S. V. Dzyadevych, 2008, **Conductometric Microbiosensors for Environmental Monitoring**, *Sensors*, 8, 2569-2588
- [6] Fajariati, D. N., S. Kurniawan, H. A. Istiqomah, O. M. Antasari, dan A. Mulyasuryani, 2015, **Pembuatan Biosensor Konduktometri untuk Penentuan Urea Menggunakan Screen Printed Carbon Electrode (SPCE)-Nata de coco**, Prosiding Seminar Nasional Kimia, Jurdik Kimia FMIPA UNY, 287-292
- [7] Sacher, R. A. dan R.A. McPherson, 2004, **Tinjauan Klinis Hasil Pemeriksaan Laboratorium**, Edisi 11, (Diterjemahkan oleh: dr. Brahm U. Pendit dan dr. Dewi Wulandari), Buku Kedokteran EGC, Jakarta
- [8] Mulyasuryani, A., A. Roosdiana, dan A. Srihardyastutie, 2010, **The Potentiometric Urea Biosensor using Chitosan Membrane**, *Indo. J. Chem.*, 10(2), 162-166
- [9] Jha, S. K., A. Topkar, dan S. F. D'Souza, 2008, **Development of Potentiometric Urea Biosensor Based on Urease Immobilized in PVA-PAA Composite Matrix for Estimation of Blood urea nitrogen (BUN)**, *Journal of Biochemical and Biophysical Method*, 70, 1145-1150
- [10] Marchenko, S. V., I. S. Kucherenko, A. N. Hereshko, I. V. Panasiuk, O. O. Soldatkin, A. V. El'skaya, and A. P. Soldatkin, 2015, **Application of Potentiometric Biosensor**

Based on Recombinant Urease for Urea Determination in Blood Serum and Hemodialyzate, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 207:981-986

- [11] Lee, W., S. Kim, T. Kim, K. S. Lee, M. Shin, dan J. Park, 2000, **Sol-gel-derived Thick-Film Conductometric Biosensor for Urea Determination in Serum**, *Analytica Chimica Acta*, 404, 2, 195-203
- [12] Goncalves, V. L., M. C. M. Laranjeira, dan V. T. Favere, 2005, **Effect of Crosslinking on Chitosan Microspheres in Controlled Release of Diclofenac Sodium**, *Polimeros: Ciencia e Tecnologia*, 15, 1, 6-12
- [13] Eggins, B. R., 2002, **Chemical Sensor and Biosensors**, John Wiley & Sons, Chichester
- [14] Kuralay, F., H. Ozyoruk, dan A. Yildiz, 2005, **Potentimetric Enzyme Electrode for Urea Determination Using Immobilized Urease in Poly(vinylferrocenium) Film**, *Sensors and Actuators, B* 109, 194-199
- [15] Gajera, H. P., S. V. Patel, B. A. Golakiya. 2008. **Fundamentals of Biochemistry A Textbook**, International Book Distributing CO, India
- [16] Manz, A., N. Pamme, dan D. Iossifidis, 2004, **Bioanalytical Chemistry**, Imperial College Press, London
- [17] Khairi, 2003, **Pembuatan Biosensor Urea dengan Transduser Tembaga**, *Jurnal Sains Kimia*, 7, 2, 40-43
- [18] Hidayati, E., 2006, **Karakterisasi Enzim Urease dari Kapang *Schizosaccharomyces pombe***, *Skripsi*, Jurusan Kimia Universitas Brawijaya, Malang
- [19] Lubbers, M. W., S. B. Rodriguez, N. K. Honey, dan R. J. Thomson, 1996, **Purification and Characterization of Urease from *Schizosaccharomyces pombe***, *Journal of Microbiology*, 42, 2, 132-140
- [20] Sigma-Aldrich, 2015, **Urease, Type III from *Canavalia ensiformis* (Jack Bean)**, www.sigmaaldrich.com, Diakses 28 Desember 2015
- [21] Balasubramanian, A. dan K. Ponnuraj, 2010, **Crystal Structure of the First Plant Urease from Jack Bean: 83 Years of Journey from Its First Crystal to Molecular Structure**, *Journal Molecular Biology*, 400, 274-283

- [22] Fidaleo, M. dan R. Lavecchia, 2003, **Kinetic Study of Enzymatic Urea Hydrolysis in the pH Range 4-9**, *Chem. Biochem. Eng. Q.*, 17, 4, 311-318
- [23] Maharani, L. D., S. Prasetyawan, dan C. Mahdi, 2013, **Optimasi Amobilisasi Urease dari *Schizosaccharomyces pombe* Menggunakan Matrik Ca-Alginat**, *Kimia Student Journal*, Vol. 2, No. 1, 421-427
- [24] Dewi, H. A., S. Prasetyawan, dan C. Mahdi, 2013, **Optimasi Amobilisasi Urease dari *Schizosaccharomyces pombe***, *Kimia Student Journal*, Vol. 2, No. 1, 428-434
- [25] Fatmawati, I., S. Prasetyawan, dan C. Mahdi, 2013, **Optimasi Amobilisasi Urease dari *Schizosaccharomyces pombe* Menggunakan Matrik Kitosan-Natrium Tripolifosfat**, *Kimia Student Journal*, Vol. 2 No.1, 407-413
- [26] Guisan, J. M., 2006, **Immobilization of Enzymes and Cells Second Edition**, Humana Press, Inc, New Jersey
- [27] Mikelsen, S. R. dan E. Corton, 2004, **Bioanalytical Chemistry**, John Wiley & Sons, Inc., USA
- [28] Gyliene, O.R., I. Tarozaitė, R., Nivnškiene, O., 2003, **Chemical Composition and Sorption properties of Chitosan Produced from Fly Larva Shells**, *Chemija (Vilnius)*, T.14 Nr.3: 121-12
- [29] Liu, C., R. Bai, dan L. Nan, 2004, **Sodium Tripolyphosphate (TPP) Crosslinked Chitosan Membranes and Application in Humic Acid Removal**, Department of Chemical and Environmental Engineering
- [30] Beppu, M. M., R. S. Vieira, C. G. Aimoli, dan C. C. Santana, 2007, **Crosslinking of Chitosan Membranes using Glutaraldehyde: Effect on Ion Permeability and Water Absorption**, *Journal of Membrane Science*, 301, 126-130
- [31] Branzoi, F. dan Viorel, 2013, **Amperometric Urea Biosensor Based Metallic Substrate Modified With a Nanocomposite Film**, Intech, <http://dx.doi.org/10.5772/52440>, 16 September 2015
- [32] Frazao, C. H., N. H. C. Silva, C. S. R. Freire, A. J. D. Silvestre, A. M. R. X. B. Xavier, dan A. P. M. Travarez, 2014, **Bacterial Cellulose as Carrier for Immobilization of Laccase: Optimization and Characterization**, *Engineering Life Science*, 14, 500-508

LAMPIRAN

Lampiran A. Preparasi Larutan

A.1 Pembuatan larutan asam asetat 0,2 M dari asam asetat glasial 99,5%

$$\text{Massa jenis CH}_3\text{COOH} = 1,050 \text{ g/mL}$$

$$\text{Mr CH}_3\text{COOH} = 60,05 \text{ g/mol}$$

$$\text{Persen CH}_3\text{COOH} = 99,5\%$$

$$\begin{aligned}\text{Massa 1 L larutan CH}_3\text{COOH} &= 1,050 \text{ g/mL} \times 1000 \text{ mL} \\ &= 1050 \text{ g}\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\text{Massa CH}_3\text{COOH dalam 1 L larutan pekat} &= 99,5 \% \times 1050 \text{ g} \\ &= 1046,85 \text{ g}\end{aligned}$$

$$\text{Mol CH}_3\text{COOH} = \frac{1046,85 \text{ g}}{60,05 \text{ g/mol}} = 17,43 \text{ mol}$$

$$\text{Maka } [\text{CH}_3\text{COOH}] \text{ dalam 1 L} = 17,43 \text{ mol/1 L} = 17,43 \text{ M}$$

Volume CH_3COOH yang diperlukan untuk membuat 100 mL larutan asam asetat 0,2 M sebagai berikut:

$$\text{Volume} = \frac{0,2 \text{ M} \times 100 \text{ mL}}{17,43 \text{ M}} = 1,15 \text{ mL}$$

A.2 Pembuatan larutan natrium asetat 1M

Larutan natrium asetat 1 M dapat dibuat dengan menimbang 8,203 g padatan natrium asetat menggunakan neraca analitik, dilarutkan dalam gelas kimia 250 mL. Larutan natrium asetat dipindah ke dalam labu ukur 100 mL, ditambah akuades hingga tanda batas, dan dikocok hingga homogen.

$$\text{Mol natrium asetat} = 1 \frac{\text{mmol}}{\text{mL}} \times 100 \text{ mL} = 100 \text{ mmol}$$

$$\text{massa natrium asetat} = 100 \text{ mmol} \times 82,03 \text{ mg/mmol} = 8,203 \text{ g}$$

A.3 Pembuatan buffer asetat pH 5,5

Buffer asetat pH 5,5 dibuat dengan cara memasukkan larutan asam asetat sebanyak x mL ke dalam larutan natrium asetat sebanyak y mL dengan perhitungan sebagai berikut:

$$\begin{array}{ll} K_a \text{ CH}_3\text{COOH} = 1,7 \times 10^{-5} & [\text{CH}_3\text{COOH}] = 0,2 \text{ M} \\ \text{pH } 5,5 & [\text{CH}_3\text{COONa}] = 1 \text{ M} \end{array}$$

Diasumsikan : Volume larutan asam asetat adalah x mL
Volume larutan natrium asetat adalah y mL
Maka : $x + y = 500 \text{ mL}$
 $x = (500 - y) \text{ mL}$

$$[\text{H}_3\text{O}]^+ = K_a \times \frac{[\text{asam}]}{[\text{basa konjugat}]}$$

$$[\text{H}_3\text{O}]^+ = K_a \times \frac{\text{mol CH}_3\text{COOH}}{\text{mol CH}_3\text{COONa}}$$

$$10^{-5,5} = 1,7 \times 10^{-5} \times \frac{0,2x}{y}$$

$$3,16 \times 10^{-6} = 1,7 \times 10^{-5} \times \frac{0,2x}{y}$$

$$0,186 = \frac{0,2x}{y}$$

$$0,186y = 0,2x$$

$$0,186y = 0,2(500 - y)$$

$$0,386y = 100$$

$$y = 259 \text{ mL}$$

Volume natrium asetat 1 M yang dibutuhkan sebesar 259 mL

Maka $x = (500 - 259) \text{ mL} = 241 \text{ mL}$

Volume asam asetat 0,2 M yang dibutuhkan sebesar 241 mL

A.4 Pembuatan larutan urea 0,2 mM

Larutan urea 0,2 mM dapat dibuat dengan menimbang 0,12 g padatan urea menggunakan neraca analitik, dilarutkan dalam gelas kimia 250 mL. Larutan urea dipindah ke dalam labu ukur 10 mL, ditambah akuades hingga tanda batas, dan dikocok hingga homogen.

$$\text{mol urea} = 0,2 \text{ mmol/mL} \times 10 \text{ mL} = 2 \text{ mmol}$$

$$\text{massa urea} = 2 \text{ mmol} \times 60,06 \text{ mg/mmol} = 0,12 \text{ g}$$

A.5 Pembuatan media padat

Media padat yang digunakan adalah Potato Dekstrosa Agar (PDA), dibuat dari 25 g kentang yang diiris tipis, direbus dalam akuades 100 mL, kemudian disaring dengan kain saring. Lalu ditambahkan 2 g dekstrosa dan 2 g agar ke dalam filtrat, kemudian pH diatur pada pH 5,5 dengan menambahkan asam asetat dan ditambahkan 5 mL buffer asetat pH 5,5, dan dipanaskan hingga seluruh komponen larut. Larutan dituangkan pada tabung reaksi kurang lebih 5,0 mL, disterilkan dalam *autoclave* selama 15 menit. Setelah itu tabung reaksi diletakkan pada posisi miring dan dibiarkan memadat selama 24 jam.

A.6 Pembuatan media cair

Media cair dibuat dengan komposisi 1 g pepton, 0,5 g ekstrak yeast, 0,5 g NaCl, 1 g dekstrosa, dan 1,6 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ dilarutkan dalam 100 mL akuades, dan ditambah 1 mL urea 0,2 mM. Kemudian diatur pH 8 dengan menambahkan asam asetat dan ditambah buffer asetat pH 8. Lalu media cair disterilkan dalam *autoclave* selama 15 menit.

A.7 Pembuatan larutan KH_2PO_4

Larutan KH_2PO_4 0,2 M; 0,07 M; 0,03 M; dan 0,01 M dapat dibuat dengan menimbang x gram padatan KH_2PO_4 menggunakan

neraca analitik, dilarutkan dalam gelas kimia 250 mL. Larutan KH_2PO_4 dipindah ke dalam labu ukur 100 mL, ditambah akuades hingga tanda batas, dan dikocok hingga homogen.

$$\text{Mol KH}_2\text{PO}_4 = 0,2 \frac{\text{mmol}}{\text{mL}} \times 100 \text{ mL} = 20 \text{ mmol}$$

$$\text{massa KH}_2\text{PO}_4 = 20 \text{ mmol} \times 136,09 \text{ mg/mmol} = 2,72 \text{ g}$$

Dengan perhitungan yang sama larutan KH_2PO_4 0,07 M; 0,03 M; dan 0,01 M dibuat dengan menimbang padatan KH_2PO_4 sejumlah tertentu (mengikuti tabel), kemudian dilarutkan ke dalam gelas kimia, dan dipindahkan ke dalam labu ukur 100 mL, ditambah akuades hingga tanda batas, dan dikocok hingga homogen.

Tabel A.1 Massa padatan KH_2PO_4 yang dibutuhkan untuk membuat larutan KH_2PO_4

Konsentrasi KH_2PO_4 (M)	Massa padatan KH_2PO_4 yang dibutuhkan (g)
0,2	2,72
0,07	0,95
0,03	0,41
0,01	0,14

A.8 Pembuatan larutan K_2HPO_4

Larutan K_2HPO_4 0,2 M; 0,07 M; 0,03 M; dan 0,01 M dapat dibuat dengan menimbang x gram padatan K_2HPO_4 menggunakan neraca analitik, dilarutkan dalam gelas kimia 250 mL. Larutan K_2HPO_4 dipindah ke dalam labu ukur 100 mL, ditambah akuades hingga tanda batas, dan dikocok hingga homogen.

$$\text{Mol K}_2\text{HPO}_4 = 0,2 \frac{\text{mmol}}{\text{mL}} \times 100 \text{ mL} = 20 \text{ mmol}$$

$$\text{massa K}_2\text{HPO}_4 = 20 \text{ mmol} \times 174,18 \text{ mg/mmol} = 3,48 \text{ g}$$

Dengan perhitungan yang sama larutan K_2HPO_4 0,07 M; 0,03 M; dan 0,01 M dibuat dengan menimbang padatan K_2HPO_4 sejumlah tertentu (mengikuti tabel), kemudian dilarutkan ke dalam gelas kimia, dan dipindahkan ke dalam labu ukur 100 mL, ditambah akuades hingga tanda batas, dan dikocok hingga homogen.

Tabel A.2 Massa padatan K_2HPO_4 yang dibutuhkan untuk membuat larutan K_2HPO_4

Konsentrasi K_2HPO_4 (M)	Massa padatan K_2HPO_4 yang dibutuhkan (g)
0,2	3,48
0,07	1,20
0,03	0,52
0,01	0,17

A.9 Pembuatan buffer fosfat pH 8

Buffer fosfat pH 8 konsentrasi 0,2 M; 0,07 M; 0,03 M; dan 0,01 M dibuat dengan cara memasukkan larutan KH_2PO_4 sebanyak x mL ke dalam larutan K_2HPO_4 sebanyak y mL dengan perhitungan sebagai berikut:

$$K_{a2} H_3PO_4 = 6,2 \times 10^{-8}$$

pH 8

$$[KH_2PO_4] = 0,2 \text{ M}$$

$$[K_2HPO_4] = 0,2 \text{ M}$$

Diasumsikan : Volume larutan KH_2PO_4 adalah x mL
Volume larutan K_2HPO_4 adalah y mL

Maka : $x + y = 500 \text{ mL}$
 $x = (500 - y) \text{ mL}$

$$[H_3O]^+ = K_{a2} \times \frac{[\text{asam}]}{[\text{basa konjugat}]}$$

$$[H_3O]^+ = K_{a2} \times \frac{\text{mol } KH_2PO_4}{\text{mol } K_2HPO_4}$$

$$10^{-8} = 6,2 \times 10^{-8} \times \frac{0,2x}{0,2y}$$

$$0,16 = \frac{0,2x}{0,2y}$$

$$0,032y = 0,2x$$

$$0,032y = 0,2 (500 - y)$$

$$0,232y = 100$$

$$x = 431 \text{ mL}$$

Volume K_2HPO_4 0,2 M yang dibutuhkan sebesar 431 mL

Maka $x = (500 - 431) \text{ mL} = 69 \text{ mL}$

Volume KH_2PO_4 0,2 M yang dibutuhkan sebesar 69 mL

Dengan perhitungan yang sama buffer fosfat 0,07 M pH 8; 0,03 M pH 8; dan 0,01 M pH 8 dibuat dengan cara mengambil larutan KH_2PO_4 sejumlah tertentu (mengikuti tabel), kemudian ditambahkan ke dalam larutan K_2HPO_4 sejumlah tertentu (mengikuti tabel) secara perlahan sambil diaduk. Lalu diukur pH larutan menggunakan pH meter yang telah dikalibrasi hingga mencapai pH yang diinginkan.

Tabel A.3 Volume larutan KH_2PO_4 dan larutan K_2HPO_4 yang dibutuhkan untuk membuat buffer fosfat pH 8

Konsentrasi buffer fosfat (M)	Volume larutan KH_2PO_4 (x) yang dibutuhkan (mL)	Volume larutan K_2HPO_4 (y) yang dibutuhkan (mL)
0,2	69	431
0,07	69	431
0,03	69	431
0,01	69	431

A.10 Pembuatan larutan BaCl_2 2% (b/v)

Larutan BaCl_2 2% dibuat dengan cara menimbang 0,2 g padatan BaCl_2 , dilarutkan dengan sedikit akuades dalam gelas kimia

100 mL. Larutan BaCl_2 dipindah ke dalam labu ukur 10 mL, ditambah akuades hingga tanda batas, dan dikocok hingga homogen.

Konsentrasi BaCl_2 2% (b/v) = 2 g / 100 mL

Maka massa BaCl_2 dalam 10 mL = $\frac{10 \text{ mL}}{100 \text{ mL}} \times 2 \text{ g} = 0,2 \text{ g}$

A.11 Pembuatan larutan HCl 0,1 M

Larutan HCl 0,1 M dibuat dengan memipet HCl 6 M sebanyak mL menggunakan pipet ukur, dimasukkan dalam labu ukur 10 mL yang telah berisi akuades, ditambahkan akuades hingga tanda batas, dan dikocok hingga homogen.

Volume HCl 6 M = $\frac{0,1 \text{ M}}{6 \text{ M}} \times 10 \text{ mL} = 0,17 \text{ mL}$

A.12 Pembuatan larutan NaOH 10% (b/v)

Larutan NaOH 10% dibuat dengan cara menimbang 5 g padatan NaOH, dilarutkan dengan sedikit akuades dalam gelas kimia 100 mL. Larutan NaOH dipindah ke dalam labu ukur 50 mL, ditambahkan akuades hingga tanda batas, dan dikocok hingga homogen.

Konsentrasi NaOH 10% (b/v) = 10 g / 100 mL

Maka massa NaOH dalam 50 mL = $\frac{50 \text{ mL}}{100 \text{ mL}} \times 10 \text{ g} = 5 \text{ g}$

A.13 Pembuatan reagen Biuret

Ditimbang 0,15 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ dan 0,6 g $\text{NaKC}_4\text{O}_6\text{H}_4$ menggunakan neraca analitik, dilarutkan dengan sedikit akuades dalam gelas kimia 100 mL, ditambah 30 mL larutan NaOH 10% sambil diaduk menggunakan pengaduk gelas. Selanjutnya, larutan

dipindahkan ke labu ukur 100 mL, ditambah akuades hingga tanda batas, dan dikocok hingga homogen.

A.14 Pembuatan larutan BSA (Bovine Serum Albumin)

a. Pembuatan larutan BSA 10000 ppm (stok)

Padatan BSA ditimbang sebanyak 1 g, dimasukkan ke dalam gelas kimia 250 mL, dan dilarutkan menggunakan sedikit akuades. Larutan BSA dipindahkan ke dalam labu ukur 100 mL, ditambah akuades hingga tanda batas, dan dikocok hingga homogen.

b. Pembuatan larutan BSA 1000 ppm

$$\text{Volume}_{\text{BSA 10000 ppm}} = \frac{1000 \text{ ppm}}{10000 \text{ ppm}} \times 10 \text{ mL} = 1 \text{ mL}$$

Larutan BSA 1000 ppm dibuat dengan cara memipet 1 mL larutan BSA 10000 ppm menggunakan pipet ukur 10 mL, dimasukkan labu ukur 10 mL, ditambah akuades hingga tanda batas, dan dikocok hingga homogen. Larutan BSA 2000 – 9000 ppm dibuat dengan cara yang sama dengan ketentuan seperti pada tabel berikut:

Tabel A.4 Volume BSA 10000 ppm yang dibutuhkan untuk membuat larutan BSA 1000 – 9000 ppm

Konsentrasi BSA (ppm)	Volume BSA yang akan dibuat (mL)	Volume BSA 10000 ppm yang dibutuhkan (mL)
0	10	0
1000	10	1
2000	10	2
3000	10	3
4000	10	4
5000	10	5
6000	10	6
7000	10	7
8000	10	8
9000	10	9

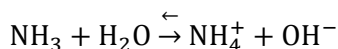
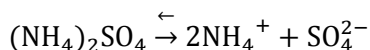
A.15 Pembuatan reagen Nessler

Ditimbang 10,0002 g HgI_2 dan 7,0024 g KI menggunakan neraca analitik, dilarutkan dengan sedikit akuades dalam gelas kimia 250mL, dan ditambahkan 16,0032 g NaOH.. Selanjutnya, larutan dipindahkan ke dalam labu ukur 50 mL, ditambah akuades hingga tanda batas, dan dikocok. Maka dihasilkan reagen Nessler konsentrasi 0,22 M.

A.16 Pembuatan larutan amonium

a. Perhitungan pembuatan larutan amonium 100 ppm dari amonium sulfat

Reaksi:



$$\text{Konsentrasi amonium} = 100 \text{ ppm dalam } 100 \text{ mL} = \frac{100 \text{ mL}}{1000 \text{ mL}} \times 100 \text{ mg}$$

$$= 10 \text{ mg}$$

$$\text{mol amonia} = \frac{10 \text{ mg}}{18 \text{ mg/mmol}} = 0,55 \text{ mmol}$$

$$\text{mol amonium sulfat} = \frac{1}{2} \times \text{mol amonia} = \frac{1}{2} \times 0,55 \text{ mmol}$$

$$= 0,275 \text{ mmol}$$

$$\text{massa amonium sulfat} = 0,275 \text{ mmol} \times 132 \text{ mg/mmol} = 0,0363 \text{ g}$$

Larutan amonium 100 ppm dibuat dengan cara ditimbang 0,0363 g amonium sulfat dilarutkan dalam gelas kimia 250 mL menggunakan akuades. Lalu dipindahkan ke dalam labu ukur 100

mL, ditambah akuades hingga tanda batas, dan dikocok hingga homogen.

b. Pembuatan larutan amonium 0 hingga 5 ppm

Larutan amonium dengan konsentrasi 0 ppm; 1 ppm; 2 ppm; 3 ppm; 4 ppm; dan 5 ppm dibuat dengan cara memipet x mL larutan amonium 100 ppm, dimasukkan labu ukur 10 mL, ditambah akuades hingga tanda batas, dan dikocok hingga homogen.

Tabel A.5 Volume larutan amonium 100 ppm yang dibutuhkan untuk membuat larutan amonium 0-5 ppm

Konsentrasi larutan amonium (ppm)	Volume amonium 100 ppm yang harus dipipet (mL)
0	0,0
1	0,1
2	0,2
3	0,3
4	0,4
5	0,5

A.17 Pembuatan larutan asam asetat 2% dari asam asetat glasial (99,5%)

Larutan asam asetat 2% dibuat dengan cara memipet 0,2 mL asam asetat glasial menggunakan pipet ukur 1 mL, dimasukkan dalam labu ukur 10 mL yang telah berisi akuades, kemudian ditambah akuades hingga tanda batas, dan dikocok hingga homogen.

$$\text{Volume CH}_3\text{COOH 99,5\%} = \frac{2\%}{99,5\%} \times 10 \text{ mL} = 0,2 \text{ mL}$$

A.18 Pembuatan larutan glutaraldehid 0,5% (v/v)

Larutan glutaraldehid 0,5% dibuat dengan cara memipet larutan glutaraldehid 25% sebanyak 0,2 mL menggunakan pipet ukur

1 mL dan dimasukkan ke dalam labu ukur 10 mL. Selanjutnya, ditambahkan akuades hingga tanda batas, dan dikocok hingga homogen.

Volume glutaraldehid 25% yang harus dipipet

$$\text{Volume} = \frac{0,5\%}{25\%} \times 10 \text{ mL} = 0,2 \text{ mL}$$

A.19 Pembuatan larutan kitosan

Ditimbang 0,1 g kitosan menggunakan neraca analitik dilarutkan dalam 10 mL larutan asam asetat 2% dan diaduk menggunakan magnetik stirrer selama 24 jam pada temperatur kamar.

A.20 Pembuatan larutan urea 50 ppm

$$\begin{aligned}\text{Konsentrasi urea} &= 50 \text{ ppm dalam } 100 \text{ mL} = \frac{100 \text{ mL}}{1000 \text{ mL}} \times 50 \text{ mg} \\ &= 5 \text{ mg} = 0,005 \text{ g}\end{aligned}$$

Larutan urea 10 ppm dibuat dengan cara menimbang 0,005 g padatan urea dilarutkan dalam gelas kimia 250 mL menggunakan akuades. Lalu dipindahkan ke dalam labu ukur 100 mL, ditambah akuades hingga tanda batas, dan dikocok hingga homogen.

A.21 Pembuatan larutan uji urea

Larutan uji urea dengan konsentrasi 0-0,5 ppm dibuat dengan cara memipet x mL larutan urea 50 ppm menggunakan pipet mikro 10-100 μL , dimasukkan labu ukur 10 mL, ditambah akuades hingga tanda batas, dan dikocok hingga homogen.

Tabel A.6 Volume larutan urea 50 ppm yang dibutuhkan untuk membuat larutan uji urea 0-0,5 ppm

Konsentrasi larutan urea (ppm)	Volume urea 50 ppm yang harus dipipet (μL)
0,00	0,0
0,05	10
0,10	20
0,15	30
0,20	40
0,30	60
0,40	80
0,50	100

Lampiran B. Prosedur Isolasi Enzim Urease

B.1 Peremajaan kultur *Schizosaccharomyces pombe*

Bakteri *Schizosaccharomyces pombe* dari biakan murni digoreskan sebanyak satu ose ke dalam media padat agar miring steril. Media padat disterilkan secara aseptik yaitu dengan membakar ujung ose pada nyala api dan mendekatkan mulut tabung pada nyala api saat penggosresan. Kemudian diinkubasi selama 4 hari pada temperatur 30 °C dalam inkubator [25].

B.2 Pembuatan inokulum (biakan aktif)

Bakteri *Schizosaccharomyces pombe* hasil peremajaan diencerkan dengan 10 mL akuades steril dan dikocok, kemudian dimasukkan ke dalam media pertumbuhan cair sebanyak 100 mL, diletakkan di atas shaker selama 22 jam dengan kecepatan 150 rpm [23-25].

B.3 Isolasi urease dari *Schizosaccharomyces pombe*

Inokulum sebanyak 10 mL dimasukkan ke dalam media cair pertumbuhan baru sebanyak 100 mL, diletakkan di atas shaker hingga 48 jam. Lalu ditambah 20 mL larutan buffer fosfat pH 8, disentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm selama 15 menit, dihasilkan supernatan yaitu ekstrak kasar urease [23-25].

B.4 Pemurnian ekstrak kasar urease

Supernatan (ekstrak kasar) urease dimurnikan dengan cara pengendapan bertingkat menggunakan $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ dengan fraksi 0-30% , 30-45%, dan proses dialisis [23-25].

1. Pengendapan 0-30%

Diambil sebanyak 40 mL ekstrak kasar urease dan ditambahkan amonium sulfat sebanyak 7,04 g. Penambahan dilakukan sedikit demi sedikit sambil diaduk dengan menggunakan

pengaduk. Setelah semua $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ yang ditambahkan larut kemudian dibiarkan 1 jam. Endapan enzim dipisahkan dengan sentrifugasi menggunakan kecepatan 3000 rpm pada suhu 4°C selama 30 menit sehingga dihasilkan supernatan 1 dan endapan 1.

2. Pengendapan 30-45%

Hasil sentrifugasi supernatan 1 ditambahkan amonium sulfat sebanyak 3,312 g. Penambahan dilakukan sedikit demi sedikit sambil diaduk dengan menggunakan gelas pengaduk. Setelah semua $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ yang ditambahkan larut kemudian dibiarkan 1 jam. Endapan enzim dipisahkan dengan sentrifugasi menggunakan kecepatan 10000 rpm pada suhu 4°C selama 45 menit sehingga dihasilkan supernatan 2 dan endapan 2.

3. Dialisis

Endapan 2 dilarutkan dalam 5 mL larutan buffer fosfat 0,2 M pH 8. Endapan yang larut dimasukkan ke dalam selofan dan didialisis dengan cara merendam selofan dalam 500 mL larutan buffer fosfat 0,07 M pH 8 pada posisi tergantung. Dialisis dilakukan selama 6 jam dengan mengganti buffer fosfat 0,03 M pH 8 setelah 3 jam. Untuk mengetahui bahwa dialisis sudah selesai buffer diuji dengan larutan HCl 0,1 M dan BaCl_2 . Caranya 2 mL buffer fosfat pH 8 yang digunakan untuk dialisis dimasukkan dalam tabung reaksi ditambah dengan 1 mL HCl 0,01 M dan beberapa tetes BaCl_2 . Apabila sudah tidak terbentuk endapan putih BaSO_4 maka dialisis dihentikan.

B.5 Penentuan kadar protein enzim

Penentuan kadar enzim dilakukan dengan metode biuret. Dibuat kurva baku BSA dengan cara sebanyak 2 mL larutan baku BSA dengan variasi konsentrasi 0, 1000, 2000, 3000, 4000, 5000, 6000, 7000, 8000, 9000 dan 10.000 ppm masing-masing dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Kemudian masing-masing variasi konsentrasi ditambah 8 mL reagen biuret dan 1 mL akuades lalu dikocok dan didiamkan selama 30 menit. Diambil BSA dengan konsentrasi 5000 ppm, selanjutnya diukur serapannya menggunakan spektrofotometer UV-Vis untuk mendapatkan panjang gelombang

maksimum. Setelah itu dilakukan pengukuran terhadap semua konsentrasi BSA pada panjang gelombang maksimum yaitu 543 nm.

Sebanyak 2 mL enzim ditambah 8 mL reagen biuret dan 1 mL akuades, setelah itu dikocok dan didiamkan selama 30 menit pada temperatur kamar. Kemudian diukur serapannya pada panjang gelombang maksimum BSA 543 nm. Hasil pengukuran diinterpolasikan pada kurva baku BSA sehingga dihasilkan kadar protein dalam sampel.

B.6 Uji aktivitas enzim

Uji aktivitas enzim dilakukan dengan metode spektrofotometri melalui pembentukan senyawa kompleks dengan reagen Nessler. Sebelum mengukur aktivitas enzim dilakukan pembuatan kurva baku yang dibuat dari amonium sulfat dengan konsentrasi amonium 0-5 ppm dan blanko dari akuades sebanyak 10 mL dengan pelarut buffer fosfat 0,2 M pH 8 dalam labu takar 10 mL. Kemudian dipindahkan dalam tabung reaksi, ditambah reagen Nessler masing-masing sebanyak 0,1 mL. Diukur absorbansinya menggunakan spektronik Genesys 20 pada panjang gelombang 400 nm [22-25].

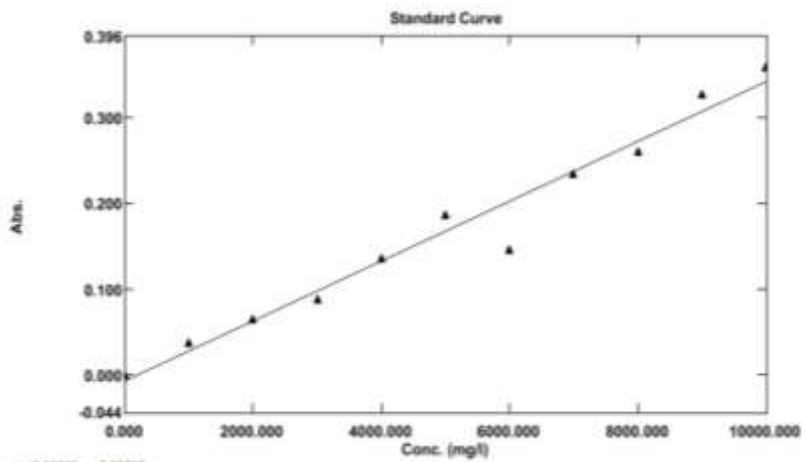
Membuat larutan urea dengan memipet larutan urea 10 ppm sebanyak 9 mL, dimasukkan labu ukur 10 mL, ditambah urease 0,5 mL dan ditandabatkan dengan buffer fosfat 0,2 M pH 8 dan diinkubasi selama 30 menit untuk enzim. Untuk tanpa enzim tidak dilakukan inkubasi. Membuat blanko dari buffer fosfat 0,2 M pH 8 sebanyak 10 mL. Masing-masing larutan ditambah reagen Nessler masing-masing 0,1 mL. Diukur absorbansinya pada λ 400 nm.

Lampiran C. Data Hasil Penelitian

C.1 Data pengukuran serapan menggunakan spektrofotometer UV-Vis untuk penentuan kadar protein urease

Tabel C.1. Serapan BSA pada 543 nm

Konsentrasi BSA (ppm)	Absorbansi
0	0,000
1000	0,038
2000	0,064
3000	0,088
4000	0,136
5000	0,187
6000	0,146
7000	0,235
8000	0,261
9000	0,328
10000	0,359



Gambar C.1 Kurva baku BSA

Tabel C.2 Serapan urease pada 543 nm

Sampel	Absorbansi	Konsentrasi enzim (ppm)
Enzim urease fraksi 30-45%	0,127	3844,568

$$y = 0,00003x - 0,00760$$

$$\text{Konsentrasi urease} \approx 3844,568 \text{ ppm BSA}$$

$$\text{BM BSA} = 66 \text{ kDa} = 66000 \text{ mg/mmol}$$

$$\text{BM urease} = 212 \text{ kDa} = 212000 \text{ mg/mmol}$$

$$\begin{aligned} \text{Mol BSA dalam 1 L} &= \frac{3844,568 \text{ mg}}{1 \text{ L}} \times \frac{1 \text{ mmol}}{66000 \text{ mg}} \\ &= 0,058 \text{ mmol dalam 1 L} \end{aligned}$$

$$\text{Mol urease} = \text{mol BSA dalam 1 L} = 0,058 \text{ mmol dalam 1 L}$$

$$\begin{aligned} [\text{urease}] &= \frac{0,058 \text{ mmol}}{1 \text{ L}} \times \frac{212000 \text{ mg}}{1 \text{ mmol}} \\ &= 12296 \frac{\text{mg}}{\text{L}} \text{ atau } 12296 \text{ ppm} \end{aligned}$$

C.2 Data pengukuran serapan untuk penentuan aktivitas enzim

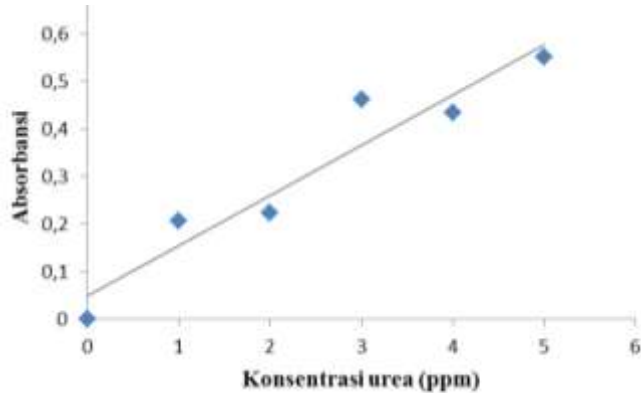
Tabel C.3 Serapan amonium pada 400 nm

Konsentrasi BSA (ppm)	Absorbansi
0	0,000
1	0,206
2	0,224
3	0,462
4	0,435
5	0,552
A	0,058
B	0,372

Keterangan:

A = 9 mL urea 10 ppm diencerkan 10 mL dengan buffer fosfat 0,2 M pH 8

B = 9 mL urea 10 ppm + 0,5 mL urease diencerkan 10 mL dengan buffer fosfat 0,2 M pH 8



Gambar C.2. Kurva baku amonium

Keterangan: $y = 0,1053x + 0,05$

$R^2 = 0,917$

Tabel C.4 Serapan urease pada 400 nm

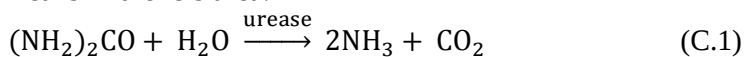
Sampel	Absorbansi
A	-0,006
B	0,230

Keterangan:

A = 9 mL urea 10 ppm diencerkan 10 mL dengan buffer fosfat 0,2 M pH 8

B = 9 mL urea 10 ppm + 0,5 mL urease diencerkan 10 mL dengan buffer fosfat 0,2 M pH 8

Reaksi hidrolisis urea:



Konsentrasi amonium awal

$$y = 0,1053x + 0,05$$

$$-0,006 = 0,1053x + 0,05$$

$$0,1053x = -0,056$$

$$x = -0,532 \mu\text{g/mL}$$

Konsentrasi amonium akhir

$$y = 0,1053x + 0,05$$

$$0,230 = 0,1053x + 0,05$$

$$0,1053x = 0,18$$

$$x = 1,709 \mu\text{g/mL}$$

$$\begin{aligned}\text{Konsentrasi amonium hasil hidrolisis} &= (1,709 - (-0,532)) \mu\text{g/mL} \\ &= 2,241 \mu\text{g/mL}\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\text{Massa amonium} &= \text{konsentrasi amonium hasil hidrolisis} \times \text{volume} \\ \text{hidrolisis} &= 2,241 \mu\text{g/mL} \times 10 \text{ mL} = 22,41 \mu\text{g} = 0,02241 \text{ mg}\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\text{Mol amonium} &= \frac{\text{massa amonium}}{\text{Mr amonium}} = \frac{0,02241 \text{ mg}}{18 \frac{\text{mg}}{\text{mmol}}} \\ &= 0,001245 \text{ mmol}\end{aligned}$$

$$\text{Mol amonia} = \text{mol amonium} = 0,001245 \text{ mmol}$$

$$\begin{aligned}\text{Mol urea} &= \frac{1}{2} \times \text{mol amonia} = \frac{1}{2} \times 0,001245 \text{ mmol} \\ &= 0,0006225 \text{ mmol}\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\text{Massa urea} &= 0,0006225 \text{ mmol} \times 60,06 \text{ mg/mmol} = 0,03739 \text{ mg} \\ &= 37,39 \mu\text{g}\end{aligned}$$

Aktivitas urease =

$$\begin{aligned}&\left(\frac{\text{massa urea} \times \text{volume uji}}{\text{Mr urea}} \right) \times \left(\frac{\text{faktor pengenceran}}{\text{volume urease} \times \text{waktu inkubasi}} \right) \\ &= \left(\frac{37,39 \mu\text{g} \times 10 \text{ mL}}{60,06 \mu\text{g/mmol}} \right) \times \left(\frac{10 \text{ mL}}{0,5 \text{ mL} \times 30 \text{ menit}} \right)\end{aligned}$$

$$= 6,225 \mu\text{mol} \times 0,074 \text{ menit}^{-1} = 0,46 \mu\text{mol/menit} \text{ atau } 0,46 \text{ unit}$$

$$\text{Jumlah enzim yang digunakan} = \frac{12296 \text{ mg}}{1000 \text{ mL}} \times 0,5 \text{ mL} = 6,15 \text{ mg}$$

$$\text{Maka aktivitas spesifik urease} = \frac{0,46 \text{ unit}}{6,15 \text{ mg}} = 0,075 \text{ unit/mg}$$

C.3 Data perhitungan pengaruh massa urease

Tabel C.5 Konversi volume urease menjadi massa urease pada pengaruh massa urease

volume urease (μL)	massa urease (mg)
5,0	0,06
10	0,12
15	0,18
25	0,31
35	0,43
45	0,55
50	0,61
55	0,68

Perhitungan:

$$\text{Volume enzim } 5 \text{ μL} = 0,005 \text{ mL}$$

Massa enzim

$$= \text{konsentrasi urease (ppm)} \times \text{volume urease yang digunakan (mL)}$$

$$= \frac{12296 \text{ mg}}{1000 \text{ mL}} \times 0,005 \text{ mL} = 0,06 \text{ mg}$$

Volume urease 10-55 μL dihitung dengan cara yang sama seperti di atas, sehingga ditunjukkan seperti pada Tabel C.5.

C.4 Data pengukuran daya hantar urea menggunakan biosensor konduktometri pengaruh massa urease

Tabel C.6 Data daya hantar larutan urea pada massa urease 0,06 mg (5 μ L)

Konsentrasi urea (ppm)	Daya hantar (μ S)				Rata-rata
	I	II	III	IV	
0,0	1402	1415	1396	1403	1404
0,1	1383	1406	1389	1402	1395
0,2	1390	1401	1375	1389	1388
0,3	1278	1388	1379	1386	1358
0,4	1286	1394	1383	1370	1358
0,5	1278	1395	1393	1372	1359

Tabel C.7 Data daya hantar larutan urea pada massa urease 0,12 mg (10 μ L)

Konsentrasi urea (ppm)	Daya hantar (μ S)				Rata-rata
	I	II	III	IV	
0,0	1368	1386	1408	1438	1400
0,1	1372	1384	1393	1436	1399
0,2	1376	1372	1399	1426	1399
0,3	1375	1374	1376	1412	1390
0,4	1377	1379	1393	1368	1377
0,5	1384	1389	1411	1441	1362

Tabel C.8 Data daya hantar larutan urea pada massa urease 0,18 mg (15 μ L)

Konsentrasi urea (ppm)	Daya hantar (μ S)				Rata-rata
	I	II	III	IV	
0,0	1397	1426	1340	1365	1387
0,1	1406	1421	1353	1379	1390
0,2	1413	1433	1344	1395	1396
0,3	1405	1425	1367	1380	1394
0,4	1469	1407	1350	1383	1402
0,5	1410	1433	1361	1449	1413

Tabel C.9 Data daya hantar larutan urea pada massa urease 0,31 mg (25 μ L)

Konsentrasi urea (ppm)	Daya hantar (μ S)				Rata-rata
	I	II	III	IV	
0,0	1266	1314	1353	1365	1343
0,1	1310	1326	1346	1334	1329
0,2	1328	1327	1340	1340	1334
0,3	1230	1305	1293	1313	1285
0,4	1046	1343	1319	1330	1260
0,5	1009	1315	1354	1333	1253

Tabel C.10 Data daya hantar larutan urea pada massa urease 0,43 mg (35 μ L)

Konsentrasi urea (ppm)	Daya hantar (μ S)				Rata-rata
	I	II	III	IV	
0,0	1214	1221	1299	1319	1263
0,1	1228	1223	1295	1319	1266
0,2	1226	1198	1303	1326	1263
0,3	1227	1231	1225	1294	1244
0,4	1225	1230	1222	1280	1239
0,5	1221	1222	1180	1271	1223

Tabel C.11 Data daya hantar larutan urea pada massa urease 0,55 mg (45 μ L)

Konsentrasi urea (ppm)	Daya hantar (μ S)				Rata-rata
	I	II	III	IV	
0,0	1337	1112	1259	1326	1258
0,1	1348	1161	1253	1321	1271
0,2	1321	1156	1261	1323	1265
0,3	1265	1171	1250	1107	1198
0,4	910	1146	1255	1252	1141
0,5	952	1180	1265	1040	1109

Tabel C.12 Data daya hantar larutan urea pada massa urease 0,61 mg (50 μ L)

Konsentrasi urea (ppm)	Daya hantar (μ S)				Rata-rata
	I	II	III	IV	
0,0	1198	1189	1310	1430	1282
0,1	1199	1207	1342	1387	1284
0,2	1191	1215	1367	1386	1290
0,3	1195	1202	1367	1383	1287
0,4	1199	1194	1384	1394	1293
0,5	1199	1194	1369	1398	1290

Tabel C.13 Data daya hantar larutan urea pada massa urease 0,68 mg (55 μ L)

Konsentrasi urea (ppm)	Daya hantar (μ S)				Rata-rata
	I	II	III	IV	
0,0	1530	1563	1414	1405	1478
0,1	1333	1558	1405	1368	1416
0,2	1348	1523	1445	1335	1413
0,3	1323	1480	1459	1385	1412
0,4	1312	1479	1377	1398	1391
0,5	1302	1437	1379	1357	1369

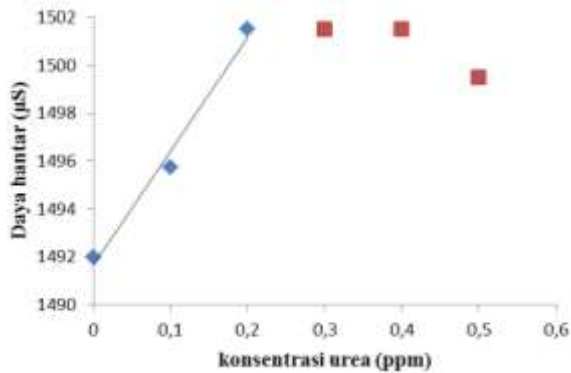
C.5 Data pengukuran daya hantar urea untuk penentuan batas deteksi biosensor konduktometri urea

Tabel C.14 Data daya hantar larutan urea untuk penentuan sensitivitas dan batas deteksi pada konsentrasi urea 0 hingga 0,5 ppm

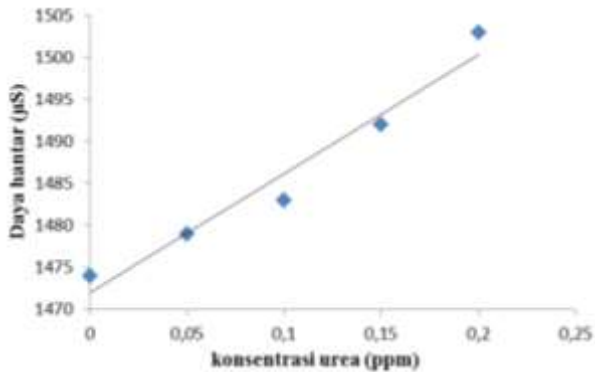
Konsentrasi urea (ppm)	Daya hantar (μ S)				Rata-rata
	I	II	III	IV	
0,0	1469	1485	1511	1503	1492
0,1	1474	1491	1512	1506	1496
0,2	1481	1486	1526	1513	1502
0,3	1470	1507	1517	1512	1502
0,4	1467	1513	1509	1517	1502
0,5	1468	1503	1512	1515	1500

Tabel C.15 Data daya hantar larutan urea untuk penentuan sensitivitas dan batas deteksi pada konsentrasi urea 0 hingga 0,2 ppm

Konsentrasi urea (ppm)	Daya hantar (μS)			Rata-rata
	I	II	III	
0,00	1476	1466	1479	1474
0,05	1482	1473	1482	1479
0,01	1483	1480	1486	1483
0,15	1506	1481	1489	1492
0,20	1515	1490	1505	1503



(a)



(b)

Gambar C.3 Hubungan antara konsentrasi urea dengan daya hantar, (a) 0 hingga 0,5 ppm; dan (b) 0 hingga 0,2 ppm

Tabel C.16 Data pengukuran daya hantar blanko penentuan batas deteksi biosensor konduktometri urea

Ulangan	Daya hantar (μS)
1	1473
2	1464
3	1460
4	1463
5	1466
6	1471
7	1465
8	1466
9	1471
10	1469
11	1460
12	1460
13	1473
14	1467
15	1463
16	1469
17	1470
18	1461
19	1468
20	1466
Sd	4,28
Yb	1466
y LOD ($3 \times \text{Sd} \times \text{Yb}$)	1479
LOD	0,05 ppm

Batas deteksi ditentukan dari 3 kali standar deviasi blanko dibagi dengan sensitivitas biosensor, yang ditunjukkan berdasarkan nilai kemiringan (a) persamaan garis $y = ax + b$ dari Gambar C.3.

Persamaan regresi linier:

$$y = 142x + 1472$$

$$1479 = 142x + 1472$$

$$7 = 142x$$

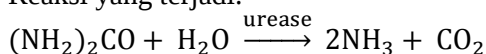
$$x = 0,05 \text{ ppm}$$

Jadi, batas deteksi biosensor konduktometri untuk penentuan urea adalah 0,05 ppm.

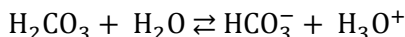
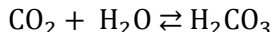
C.6 Perhitungan teoritis produk hidrolisis urea oleh urease

Misal perhitungan dilakukan pada konsentrasi urea 0,1 ppm (mg/L) memiliki volume urea sebanyak 300 μ L atau 0,3 mL dan pH larutan adalah 8. Maka $[H_3O^+]$ dan $[OH^-]$ total dapat dihitung sebagai berikut:

Reaksi yang terjadi:



Reaksi kesetimbangan karbondioksida



$$\text{massa urea} = 0,1 \mu\text{g/mL} \times 0,3 \text{ mL} = 0,03 \mu\text{g} \approx 3 \times 10^{-5} \text{ mg}$$

$$\text{mol urea} = \frac{3 \times 10^{-5} \text{ mg}}{60,06 \text{ mg/mmol}} = 4,9 \times 10^{-7} \text{ mmol}$$

$$\text{mol amonia} = 2 \times \text{mol urea} = 2 \times (4,9 \times 10^{-7} \text{ mmol})$$

$$= 9,8 \times 10^{-7} \text{ mmol}$$

$$\text{mol karbondioksida} \approx \text{mol urea} = 4,9 \times 10^{-7} \text{ mmol}$$

$$[\text{amonia}] = \frac{\text{mol amonia}}{\text{volume}} = \frac{9,8 \times 10^{-7} \text{ mmol}}{0,3 \text{ mL}} = 32,67 \times 10^{-7} \text{ M}$$

$$[\text{CO}_2] = \frac{\text{mol karbondioksida}}{\text{volume}} = \frac{4,9 \times 10^{-7} \text{ mmol}}{0,3 \text{ mL}} = 16,3 \times 10^{-7} \text{ M}$$

a. Perhitungan $[\text{H}_3\text{O}^+]$ dari CO_2

Misal:

$[\text{A}^-]$ merupakan HCO_3^-

$[\text{HA}]$ merupakan konsentrasi H_2CO_3 saat kesetimbangan

C_{HA} merupakan konsentrasi total H_2CO_3

$$[\text{A}^-] \approx [\text{H}_3\text{O}^+]$$

$$C_{\text{HA}} = [\text{HA}] + [\text{A}^-]$$

$$[\text{HA}] = C_{\text{HA}} - [\text{H}_3\text{O}^+]$$

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

$$K_a = \frac{[\text{H}_3\text{O}^+]^2}{C_{\text{HA}} - [\text{H}_3\text{O}^+]}$$

$$[\text{H}_3\text{O}^+]^2 + K_a[\text{H}_3\text{O}^+] - K_a C_{\text{HA}} = 0$$

$$ax^2 + bx + c = 0$$

$$[\text{H}_3\text{O}^+] = \frac{-b \pm \sqrt{b^2 - 4ac}}{2a}$$

$$[\text{H}_3\text{O}^+] = \frac{-K_a \pm \sqrt{(K_a)^2 + 4K_a C_{\text{HA}}}}{2 \times 1}$$

$$\begin{aligned} & [\text{H}_3\text{O}^+] \\ &= \frac{-4,8 \cdot 10^{-11} \pm \sqrt{(4,3 \cdot 10^{-7})^2 + (4 \times 4,3 \cdot 10^{-7} \times 16,3 \cdot 10^{-7})}}{2 \times 1} \end{aligned}$$

$$[\text{H}_3\text{O}^+] = \frac{-4,8 \cdot 10^{-11} \pm \sqrt{18,49 \cdot 10^{-14} + 280,36 \cdot 10^{-14}}}{2}$$

$$[\text{H}_3\text{O}^+] = \frac{-4,8 \cdot 10^{-11} \pm \sqrt{298,85 \cdot 10^{-14}}}{2}$$

$$[\text{H}_3\text{O}^+] = \frac{-0,00048 \cdot 10^{-7} + 17,29 \cdot 10^{-7}}{2}$$

$$[\text{H}_3\text{O}^+] = \frac{17,29 \cdot 10^{-7}}{2} = 8,65 \cdot 10^{-7} \approx 86,5 \cdot 10^{-8}$$

Jadi:

$$[\text{H}_3\text{O}^+]_{\text{total}} = [\text{H}_3\text{O}^+]_{\text{CO}_2} + [\text{H}_3\text{O}^+]_{\text{larutan}}$$

$$[\text{H}_3\text{O}^+]_{\text{total}} = 86,5 \times 10^{-8} + 1 \times 10^{-8} = 87,5 \times 10^{-8}$$

b. Perhitungan $[\text{OH}^-]$ dari NH_3

Misal:

$[\text{B}^+]$ merupakan NH_4^+

$[\text{B}]$ merupakan konsentrasi NH_3 saat kesetimbangan

C_B merupakan konsentrasi total NH_3

$$[\text{B}^+] \approx [\text{OH}^-]$$

$$C_B = [\text{B}] + [\text{B}^+]$$

$$[\text{B}] = C_B - [\text{H}_3\text{O}^+]$$

$$K_b = \frac{[\text{NH}_4^+][\text{OH}^-]}{[\text{NH}_3]}$$

$$K_b = \frac{[\text{OH}^-]^2}{C_B - [\text{OH}^-]}$$

$$[\text{OH}^-]^2 + K_b[\text{OH}^-] - K_b C_B = 0$$

$$ax^2 + bx + c = 0$$

$$[\text{OH}^-] = \frac{-b \pm \sqrt{b^2 - 4ac}}{2a}$$

$$[\text{OH}^-] = \frac{-K_b \pm \sqrt{(K_b)^2 + 4K_b C_B}}{2 \times 1}$$

$$[\text{OH}^-] = \frac{-1,8 \cdot 10^{-5} \pm \sqrt{(1,8 \cdot 10^{-5})^2 + (4 \times 1,8 \cdot 10^{-5} \times 32,67 \cdot 10^{-7})}}{2 \times 1}$$

$$[\text{OH}^-] = \frac{-1,8 \cdot 10^{-5} \pm \sqrt{3,24 \cdot 10^{-10} + 2,35 \cdot 10^{-10}}}{2}$$

$$[\text{OH}^-] = \frac{-1,8 \cdot 10^{-5} \pm \sqrt{5,59 \cdot 10^{-10}}}{2}$$

$$[\text{OH}^-] = \frac{-1,8 \cdot 10^{-5} + 2,36 \cdot 10^{-5}}{2}$$

$$[\text{OH}^-] = \frac{0,56 \cdot 10^{-5}}{2} = 0,28 \cdot 10^{-5} \approx 2,8 \cdot 10^{-6}$$

Jadi:

$$[\text{OH}^-]_{\text{total}} = [\text{OH}^-]_{\text{NH}_3} + [\text{OH}^-]_{\text{larutan}}$$

$$[\text{OH}^-]_{\text{total}} = 2,8 \times 10^{-6} + 1 \times 10^{-6} = 3,8 \times 10^{-6}$$

C.7 Perhitungan teoritis pH garam dari hasil hidrolisis urea NH_4HCO_3

$$[\text{H}^+] = \sqrt{\frac{K_{a1}K_w}{K_b}}$$

$$[\text{H}^+] = \sqrt{\frac{4,3 \cdot 10^{-7} \times 10^{-14}}{1,8 \cdot 10^{-5}}}$$

$$[\text{H}^+] = \sqrt{2,4 \cdot 10^{-16}} = 1,55 \cdot 10^{-8}$$

$$\text{pH} = -\log[\text{H}^+] = -\log 1,55 \cdot 10^{-8} = 8 - \log 1,55 = 8 - 0,2$$

$$\text{pH} = 7,8$$

Berdasarkan perhitungan teoritis, maka pada pH 8, ion hasil hidrolisis urea dimungkinkan dapat membentuk garam NH_4HCO_3

C.8 Perhitungan teoritis kemampuan urease menghidrolisis urea

Tabel C.17 Perhitungan teoritis konsentrasi urea yang dapat dihidrolisis oleh urease pada berbagai massa urease selama 13 detik dan volume urea 0,3 mL

massa urease (mg)	Konsentrasi urea yang dapat terhidrolisis (ppm)
0,06	0,2
0,12	0,4
0,18	0,6
0,31	1,0
0,43	1,4
0,55	1,8
0,61	2,0
0,68	2,2

Massa urease 0,18 mg

Pengukuran dilakukan selama 13 detik

Aktivitas spesifik urease = 0,075 $\mu\text{mol}/\text{mg}$ menit

Perbandingan urease dalam 1 menit atau 60 detik

$$\frac{0,075 \mu\text{mol}/\text{menit}}{1 \text{ mg}} = \frac{x}{0,18 \text{ mg}}$$

$x = 0,014 \mu\text{mol}$ dalam satu menit

$$\frac{0,014 \mu\text{mol}}{60 \text{ detik}} = \frac{x}{13 \text{ detik}}$$

$x = 0,003 \mu\text{mol}$

jadi mol urea yang dapat terhidrolisis oleh urease 0,42 mg dalam waktu 13 detik sebesar 0,003 μmol .

$$\text{Massa urea} = 0,003 \mu\text{mol} \times 60,06 \mu\text{g}/\mu\text{mol} = 0,18 \mu\text{g}$$

$$\text{Konsentrasi urea} = \frac{0,18 \mu\text{g}}{0,3 \text{ mL}} = 0,6 \text{ ppm}$$

Dengan perhitungan yang sama, maka massa urease lain sejumlah tertentu (mengikuti Tabel C.17).