

MODIFIKASI ELEKTRODA ENZIM DENGAN SENYAWA ORGANIK MACROPHOTOINIFERTER PADA PERMUKAAN MEMBRAN PVC UNTUK BIOSENSOR

I Nyoman Tika

Jurusan Pendidikan Kimia, FMIPA Undiksha, Singaraja Bali Indonesia
Jl. Udayana No.12 Singaraja Bali

Abstrak

Modifikasi elektroda enzim dengan senyawa organik macrophotoiniferter pada permukaan membrane PVC telah dilakukan. Senyawa organik sebagai macrophotoiniferter digunakan adalah 2-ethylhexyl metacrylate (EHM) dan 4-Vinylbenzyl N,N-dietyldithiocarbamate (VBDC). Sensitifitas elektroda enzim lipase diukur pada rentang berbagai pH dan suhu dengan minyak olive sebagai substrat. Sistem biosensor yang digunakan dengan mengembangkan elektroda DO meter yang dimodifikasi menjadi elektroda enzim. Hasil penelitian menunjukkan rentang kerja biosensor didapatkan pada pH 6,5 hingga 7,0 dan rentang suhu adalah 30-40°C. Modifikasi elektroda enzim dengan senyawa organik macrophotoiniferter pada permukaan membrane PVC dapat digunakan digunakan dalam sistem biosensor pada alat DO meter.

Kata-Kata Kunci: elektroda enzim, biosensor, senyawa macrofotoiniferter

1. Pendahuluan

Biosensor menjadi andalan dalam analisis gliserida dalam darah, karena cepat dan murah. Hal ini disebabkan meningkatnya gliserida dalam darah dapat menyebabkan resiko arterikoronari (CAD, *Coronary artery disease*) (Klotzsch and Namara, 1990). Trigliserida total dalam serum darah sebagai indikator ketidaknormalan metabolisme lipid, pada tubuh seseorang ada kecenderungan terkena penyakit arteroklerosis dan hipertensi (Wallach, 1996). Sejumlah metode yang telah diterapkan, seperti secara kimia (Handel and Zipersmit, 1957). Pengukuran dengan metode enzimatik (Fosatti and Prensipe, 1982); Fluorometri (Voysey and Wilto, 1994); Bioluminisense (Lowry, 1951); Kromatografi (Bjorkhem *et al.*, 1989). Metode-metode ini tidak populer, sebab presisinya sangat rendah, peralatan yang digunakan sangat mahal, membutuhkan *pretreatment* (perlakuan awal) dan derivatisasi analit yang relatif besar. Sehingga biosensor menjadi primadona dalam analisis gliserida. Biosensor yang digagas adalah dengan menggunakan gabungan enzim lipase termostabil yang di-*co-immobilized*. (Herrera-López EJ. 2012).

Teknik *co-immobilized* ini dapat digunakan lebih dari satu kali, sehingga dapat menurunkan biaya. Oleh karena itu penggunaan beberapa bahan pendukung imobilisasi enzim terus dikembangkan untuk analisis gliserida dalam darah, seperti dengan menggunakan *akylamine glass*

bead (Minaksi and Pundir, 2005). Penelitian untuk *co-immobilized* dengan berbagai membran terus dijajagi (Bhambi *et al.*, 2006), Penggunaan PVC dan Zeolit alam telah dilakukan, lipase termostabil isolat Banyuwedang dapat digunakan untuk membuat elektroda enzim untuk biosensor (Tika, dkk, 2008).

Enzim lipase yang diamobil kemudian digabungkan dengan enzim Gliserol Kinase (GK), dan Gliseraldehid-3-Fosfat Oksidase (GFO). Penjajagan pada waktu respon 10 detik dilakukan untuk konsentrasi 0,5 mM-1,5 mM, gliserida standar dengan konsumsi oksigen 5 mg/L. Kondisi ini masih belum optimal. Penggunaan enzim lipase dalam rangkaian biosensor untuk analisis gliserida darah mengikuti alur mekanisme reaksi enzimatik, yang dapat diuraikan sebagai berikut : tirgliserida yang terkandung dalam darah akan dipecah oleh enzim lipase menjadi asam lemak dan gliserol. Gliserol yang dihasilkan dengan bantuan ATP kemudian dipecah oleh enzim gliserol kinase (GK) menjadi gliserol-3-fosfat dan ADP, selanjutnya gliserol 3-fosfat dan O₂ dengan kerja enzim gliserol-3-fosfat oksidase (GPO) diubah menjadi dehidroksiaseton fosfat (DHAP) dan H₂O₂ berkurangnya kelarutan oksigen dalam sistem reaksi diukur sebagai parameter penting dalam biosensor. Titik kritis menggunakan rangkaian enzim sebagai elektroda enzim terletak pada membran yang digunakan. PVC sebagai *solid support* untuk lipase, GK, GFO memiliki kelebihan, yakni murah tidak beracun dan memiliki daya ikat yang tinggi

(Tika, dkk, 2008), namun penggunaan lipase termostabil untuk kenaikan suhu tertentu, ternyata PVC menurunkan aktivitas lipase, sehingga kepekaan elektroda gabungan enzim berkurang. Penelitian untuk mengaplikasikan enzim lipase termostabil isolat Banyuwedang dalam kesehatan menarik untuk terus dikaji.

Dalam paper ini dibahas mengetahui faktor (suhu dan pH) untuk dalam pengukuran elektroda enzim, yang dimodifikasi pada membran PVC telah dilapisi dengan senyawa organik (*macrophotoiniferter*). Untuk respon optimum hubungan linear antara konsentrasi trigliserida (TG) dengan konsentrasi oksigen (mg/mL) yang terbentuk oleh rangkaian lipase termostabil yang dikaitkan dengan membran PVC yang dilapisi senyawa organik *macrophotoiniferter*s.

2. Metode Penelitian

Bahan

Semua bahan yang digunakan memiliki tingkat proanalisis dan tingkat biologik, kecuali bila disebutkan khusus dalam teks. NH_4Cl , Tris (Hidroksimetil)-amino metan dan HCl (Asam klorida) DTT, EDTA, EGTA, PSMF (*phenylmethylsulfonyl fluoride*), pepstatin dan leupeptin (Sigma, USA). Natrium pirofosfat (Sigma, USA), TCA (Sigma, USA), etanol 70%. Uji protein menggunakan kit reagen Bio-rad). Isolat lipase dari *Bacillus* BYW2 (Isolat Air panas Banyuwedang) yang memiliki suhu optimum 0°C. EGTA(Sigma) dan minyak olive, enzim gliserol kinase (GK) dan enzim gliserol-3-fosfat oksidase (GPO). Senyawa organik Macrofotoiniferter : 2-ethylhexyl metacrylate (EHM) + 4-Vinylbenzyl N,N-dietyldithiocarbamate (VBDC)

Pembuatan membran PVC

Membran yang diujicobakan dalam penelitian ini adalah membran yang diujicobakan dalam penelitian ini adalah PVC. PVC sebanyak 0,06 g dan 150 mL *isopropil miristat* dilarutkan dalam 5 mL *tetrahidrofuran* (THF). Larutan polimer ditempatkan dalam *Petri dish* (diameter 9 cm). Larutan polimer diratakan pada permukaan petri untuk mendapatkan distribusi polimer yang merata. Larutan polimer ditutupi dengan gelas sehingga terjadi penguapan pelan-pelan, sehingga dihasilkan yang tipis, kemudian dilapisi dengan senyawa organik *macrophotoiniferter*. Membran PVC yang diperoleh dipotong dengan bentuk batang-batang kecil (2x1 cm) dicuci dengan air dan diaktivasi dengan glutaraldehida 2,5%.

Setelah membran diaktivasi, kelebihan glutaraldehida didekantasi, lalu membran dicuci dengan buffer Natrium Fosfat 0,1 M (pH 7,0), sampai air cucian pH 7,0.

Amobilisasi Lipase

Membran PVC dicuci dengan air dan batang-batang kecil kemudian dipotong dan diaktivasi dengan glutaraldehida 2,5%. Setelah membran diaktivasi, kelebihan glutaraldehida didekantasi, lalu membran dicuci dengan buffer Natrium fosfat 0,1 M (pH 7,0), sampai air cucian pH 7,0. Sebanyak 1 mL enzim lipase termostabil Banyuwedang ditambahkan untuk mengaktivasi membran dan disimpan pada suhu 4°C. Enzim yang tidak terikat didekantasi dan diuji untuk menentukan kadar protein sesuai prosedur yang dikembangkan oleh Voysey dan Wilton (1994) dan Lowry (1951). Membran dicuci 3-4 kali dengan menambahkan bufer (Na-fosfat 0,1 M; pH 7) sampai tidak ada aktivitas yang terdeteksi pada air cucian.

Karakterisasi enzim amobil

Untuk karakterisasi amobil menggunakan metode yang dikembangkan oleh Dutcher, 1993. yaitu dibuat substrat minyak olive dalam berbagai pH kemudian aktivitas ditentukan sesuai dengan prosedur B. Setelah diketahui pH optimum kerja enzim amobil dilakukan pengujian pada suhu optimum inkubasi. Inkubasi dilakukan dalam berbagai suhu: 45; 50; 55; 60; 65; 70; 75; 80°C

Penyiapan Elektroda

Setelah enzim diamobilisasi (*immobilized*) dikarakterisasi dilakukan pembuatan elektroda enzim. Zeolit -enzim dicampur dengan gel kemudian ditempelkan pada salah satu elektroda dari Voltameter. Elektroda enzim disimpan dalam buffer reaksi 0,1 M Natrium Fosfat (pH 7,0) pada suhu 4°C bila tidak digunakan. Penggunaan kembali elektroda, melalui proses pencucian terlebih dahulu elektroda dengan air destilasi pada suhu kamar dan dilanjutkan dengan bufer reaksi, selanjutnya dikeringkan dengan tisu.

Konstruksi dan Pengujian Biosensor

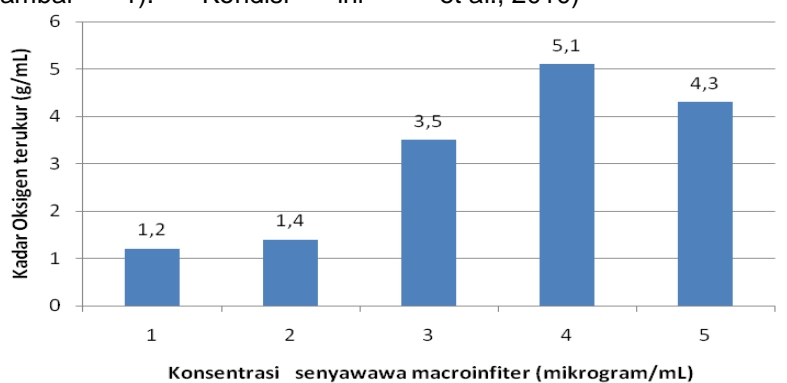
Elektroda enzim yang telah dihubungkan dengan alat Voltameter siap digunakan. Dipepet sebanyak 1,8 mL Na-Fosfat (0,1 M pH 7) kedalam gelas kimia. Ditambahkan 0,1 mL campuran minyak olive ditambahkan ke dalam buffer reaksi. Kelarutan hidrolisis gliserida dapat dideteksi dengan mencelupkan elektroda enzim.

3. Hasil Dan Pembahasan

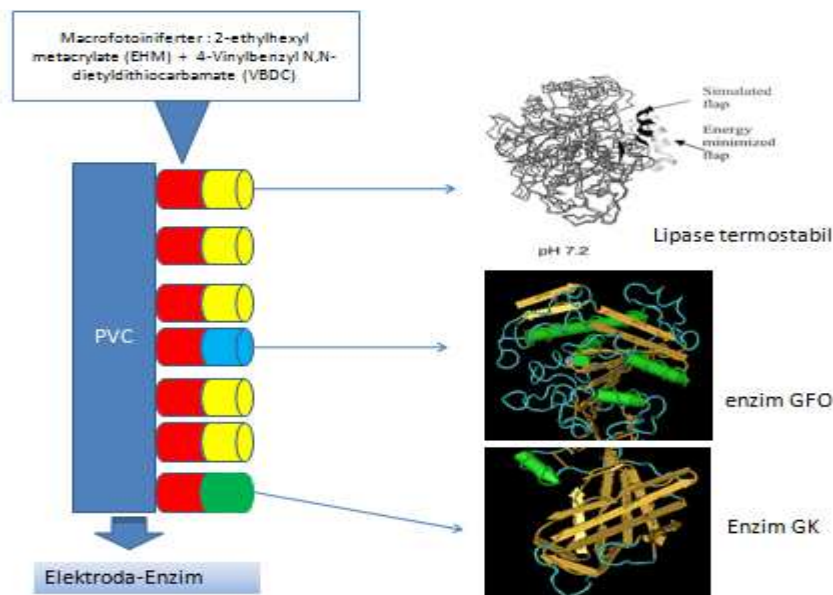
Lipase dengan gabungan enzim yang lain (GK dan GPO) diko-amobilisasi

dengan PVC yang dilapisi dengan senyawa organik *macrophotoiniferter* pada berbagai konsentrasi, aktivitas elektroda menunjukkan bahwa pada konsentrasi 1 µg/mL memiliki aktivitas 1,2 g/mL, konsentrasi 2 µg/mL memiliki aktivitas 1,4 µg/mL, dan konsentrasi optimum ditunjukkan pada konsentrasi 4 µg/mL yaitu sebesar 5,1 g/mL, dan peningkatan konsentrasi menjadi 5 µg/mL kadar oksigen yang terukur sebesar 4,3 g/mL. Artinya terjadi penurunan kemampuan enzim terikat pada membrane yang dilapisi senyawa organik (Gambar 1). Kondisi ini

menunjukkan bahwa kenaikan senyawa *macrofotoiniferter* tidak seklaigus meningkatkan konsentrasi oksigen terukur. Membran PVC yang dilapisi dengan senyawa organik *macrofotoiniferter* itu jenuh dan berpengaruh pada kerja enzim. Penelitian ini paralel dengan penelitian Song *et al.* (2010), yaitu kejenuhan terjadi pada matrik pengikat enzim sehingga menyebabkan konformasi yang padat. Kondisi ini akan menggagu aktivitas gabungan enzim sehingga aktivitas berantai gabungan enzim menjadi menurun (Cui L. *et al.*, 2010)



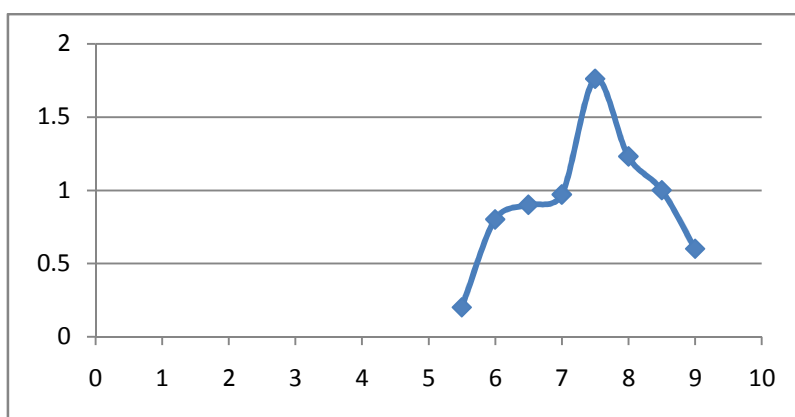
Gambar 1. Pengaruh penambahan senyawa macroiniferter terhadap konsumsi oksigen.



Gambar 2. Model modifikasi elektroda dengan VPC yang dilapisi dengan senyawa Macrofotoiniferter : 2-ethylhexyl metacrylate (EHM) dan 4-Vinylbenzyl N,N-dietyldithiocarbamate (VBDC)

Karakteristik elektroda enzim yang menggunakan membran PVC telah dilapisi dengan senyawa organik (*macrophotoiniferter*) dilakukan terhadap pengaruh pH dan perubahan suhu pengukuran. Karakteristik elektroda enzim menunjukkan aktivitas 0,2 mg/mL pada pH 5, meningkat 5 kali lipat pada pH 7, dan menjadi 9 kali lipat pada pH 7,5. pH 7.5 adalah pH optimum kinerja elektroda enzim yang diamobil dengan PVC (gambar 2). Hal

ini dapat dijelaskan bahwa semakin mendekati kondisi basa, donor proton semakin berkurang sehingga meningkatkan aktivitas enzim, artinya aktif site enzim didominasi asam amino yang bersifat asam, sehingga terjadi peningkatan muatan pada pH basa. Kondisi ini sesuai dengan temuan pada gabungan enzim yang dilakukan Bhambi *et al.*, (2006),



Gambar 3. Pengaruh pH terhadap kinerja elektroda-enzim.

Penentuan rentang kerja elektrode pada berbagai pH

Tabel 1. Rentang Kerja Elektrode-Enzim pada Berbagai pH

Ph	Kontrol (x) ppm	Eksperimen (y) ppm
6,0	5.46	5.32
6,5	5.56	5.40
7,0	5.52	5.31
7,5	5.44	5.20
8,0	5.54	5.28

Data hasil pengukuran rentang kerja elektrode kontrol dan eksperimen pada berbagai pH serta konsumsi oksigen yang digunakan dapat dilihat pada Tabel 1. Tabel tersebut menunjukkan bahwa ada kenaikan konsumsi oksigen secara praktik dari pH 6,0 hingga pH 8,0. Penentuan Rentang Kerja pH adalah dengan melihat konsumsi oksigen terendah antara kelompok eksperimen dan kontrol. Penurunan terkecil konsumsi oksigen adalah rentang 6,0-7,0. Hal ini menunjukkan rentang kerja yang paling dileransi adalah pada rentang tersebut. Kondisi ini sesuai dengan temuan Narang J and Pundir CS (2011)

Salah satu variabel yang digunakan dalam menentukan rentang kerja dari biosensor yaitu pH. Pada penelitian ini digunakan variasi pH yaitu 6,0; 6,5; 7,0; 7,5; dan 8,0 (Bhambi *et al.*, 2006). Variasi pH ini diujikan pada dua jenis elektrode yang berbeda yaitu elektrode yang hanya menggunakan membran PVC tanpa menggunakan enzim (Elektrode Kontrol) dan elektrode yang menggunakan membran PVC serta enzim yang teramobil pada membran (Elektrode Eksperimen). Semua perlakuan tersebut dilakukan pada suhu kamar.

Berdasarkan data hasil pengukuran dengan menggunakan elektrode kontrol dan elektrode eksperimen seperti pada Tabel 1. dapat terlihat konsentrasi kelarutan oksigen yang terukur pada elektrode kontrol dan elektrode eksperimen. Jika diamati konsentrasi kelarutan oksigen pada pengukuran menggunakan elektrode eksperimen mengalami penurunan dari hasil pengukuran menggunakan elektrode kontrol. Penurunan ini disebabkan oleh bereaksinya emulsi minyak olive dengan enzim-enzim yang terdapat pada membran PVC, dimana enzim-enzim tersebut akan mengubah oksigen pada larutan menjadi hidrogen peroksida seperti reaksi pada Gambar 5. Berubahnya oksigen menjadi hidrogen peroksida dinyatakan sebagai oksigen terkonsumsi. Besarnya konsumsi oksigen ini dapat dihitung dengan mengurangkan hasil pengukuran elektrode kontrol dengan hasil pengukuran pada elektrode eksperimen. Adapun konsumsi oksigen yang diperoleh terlihat pada Tabel

Penentuan Rentang Kerja Elektrode Pada Berbagai Suhu

Data hasil pengukuran rentang kerja elektrode kontrol dan eksperimen pada berbagai suhu disajikan pada Tabel 2.

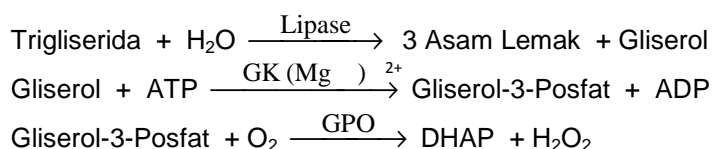
Tabel 2. Rentang Kerja Elektrode pada Berbagai Suhu

Suhu (°C)	pH	Kontrol (x) ppm	Eksperimen (y) ppm
10	7,0	6.32	5.97
20	7,0	5.86	5.57
30	7,0	5.52	5.31
40	7,0	4.96	4.79
50	7,0	3.87	3.73
60	7,0	1.94	1.82
70	7,0	1.24	1.14

Data hasil pengukuran rentang kerja elektrode kontrol dan eksperimen pada berbagai suhu serta konsumsi oksigen yang digunakan dapat dilihat pada Tabel 1. Tabel tersebut menunjukkan bahwa terjadi penurunan konsumsi oksigen secara praktik mulai dari suhu 10°C hingga suhu 70°C. Penurunan terkecil konsumsi oksigen

adalah rentang 30-40°C. Hal ini menunjukkan rentang kerja yang paling dileransi adalah pada rentang tersebut. Kondisi ini sesuai dengan temuan Narang J and Pundir CS (2011)

Adapun reaksi yang terjadi pada saat pengukuran menggunakan elektrode eksperimen adalah sebagai berikut:



Gambar 5. Reaksi-reaksi yang terjadi pada elektrode Eksperimen

Seperti terlihat dalam reaksi pada Gambar 5. ada tiga jenis enzim yang digunakan yaitu lipase yang berasal dari Isolat Banyuwedang yang berfungsi mengubah trigliserida menjadi asam lemak dan gliserol. Kemudian gliserol yang dihasilkan akan diubah menjadi gliserol-3-posfat dan ADP oleh enzim Gliserol Kinase (GK) dengan prekursor Mg^{2+} dimana pada proses tersebut terlebih dahulu ditambahkan ATP. Kemudian proses terakhir adalah perubahan gliserol-3-posfat menjadi DHAP dan H_2O_2 oleh enzim GPO (gliserol-3-posfat Oksidase). Reaksi tersebut mengakibatkan berkurangnya konsentrasi kelarutan oksigen yang terukur pada elektrode eksperimen jika dibandingkan dengan elektrode kontrol. Berkurangnya konsentrasi kelarutan oksigen disebabkan karena oksigen dalam larutan berubah membentuk H_2O_2 . Jika hasil pengukuran konsentrasi oksigen terlarut dari elektrode kontrol (elektrode membran PVC-tanpa enzim) dikurangi hasil pengukuran konsentrasi oksigen terlarut dari elektrode eksperimen (elektrode membran PVC-enzim) maka akan diperoleh konsentrasi oksigen yang berkurang karena berubah menjadi H_2O_2 (konsumsi oksigen). Berdasarkan Tabel 3. diperoleh kenaikan konsumsi oksigen seiring bertambahnya volume emulsi minyak olive yang digunakan. Semakin besar volume emulsi minyak olive

yang digunakan maka semakin besar pula konsumsi oksigen.

4. Kesimpulan

Berdasarkan hasil pembahasan di atas dapat disimpulkan bahwa rentang kerja biosensor didapatkan pada pH 6,5 hingga 7,0 dan rentang suhu adalah 30-40°C. Modifikasi elektroda enzim dengan senyawa organik macrophotoiniferter pada permukaan membrane PVC dapat digunakan digunakan dalam sistem biosensor pada alat DO meter.

5. Daftar Pustaka

- Akhmaloka, I.N.Tika, H.Pramono and M. Sindumarta, 2000a. Isolation and characterization of DNA polymerase from a local thermophilic microorganism, *J.M.S.*, 4, 335-343.
- Akhmaloka, H.Pramono, I N.Tika, A.Suharto, D.S. Retnoningrum, M. Sindumarta, K.Padmawinata, dan B.L. Oei, 2000b. Eksplorasi potensi bakteri termofilik isolat lokal : Studi kasus DNA polimerase termostabil, *Prosiding Seminar hasil penelitian dan pengembangan Bioteknologi II*, Cibinong 7-9 Maret 2000: 31-39.
- Bradford, M. M.,1976. A rapid and sensitive Method for the Quantitation of

- Microgram Quantities of protein utilizing the principle of protein–Dye Binding, *Anal.Biochem.*, 72, 248-254.
- Bhambi, M., Minakshi and C.S Pundir (2006), Preparation of Oxygen Meter Based Biosensor for Determination of Triglyceride in Serum, *Sensor & Transducers Magazine (S & T e-Digest)*, Vol. 67, issue 5 pp.561-567
- Cui L, Yin H, Dong J, Fan H, Liu T, Ju P, Ai S., 2010 A mimic peroxidase biosensor based on calcined layered double hydroxide for detection of H₂O₂. *Biosens Bioelectron* 31.
- Herrera-López EJ. 2012, Lipase and phospholipase biosensors: a review. *Methods Mol Biol.* 2012;861:525-43
- Klotzsch, S.G, and J.R McNamara. 1990. *Trygliceride measurement : reviw of methods and interferences*, *Clin. Chem.* 36, pp 1605-1613.
- Madigan, M.T., J. M. Martindo and J.Parker, 1997. *Brock Biology of Microorganisms*, Eight Ed., Prentice Hall Int., Inc, New York.
- Madigan, M. T. and B.L. Mars, 1997. Extremophiles, *Sci. Am.*, 276 (4) : 66-71
- Murray, K.R., K.D. Granner, P. A. Mayes and W.V. Rodwell (1996), *Harper Biochemistry*, Apleton & Lange, New York.
- Narang J and Pundir CS. 2011, Construction of a triglyceride amperometric biosensor based on chitosan-ZnO nanocomposite film. *Int J Biol Macromol.* 2011 Nov 1;49(4):707-15. Epub 2011 Jul 7.
- Narang J, Minakshi, Bhambi M, Pundir CS. 2010, Determination of serum triglyceride by enzyme electrode using covalently immobilized enzyme on egg shell membrane. *Int J Biol Macromol.* 2010 Dec 1;47(5):691-5. Epub 2010 Sep 9.
- Song W, Li DW, Li YT, Li Y, Long YT.2010, Disposable biosensor based on graphene oxide conjugated with tyrosinase assembled gold nanoparticles. *Biosens Bioelectron.* Dec 30
- Tika, I N., H.Pramono, M Sindumarta, K. Padmawinata dan Akhmaloka 2003. Isolasi dan Karakterisasi Bakteri Termofilik dari Sumber Air Panas Cimanggu, Bandung, Jawa Barat, *Proseding Seminar PIT, Permi*, 29-30 agustus 2003
- Tika, I N., D., Natalia, Akhmaloka , Muliawati S., dan K. Padmawinata, 2000. Isolasi dan Pemurnian Parsial DNA Polimerase Termostabil dari Bakteri Termofilik Isolat Lokal, *Seminar Kimia Bersama*, Yogyakarta, 12-13 April 2000.
- Tika, I N. 2005. Studi Biokimia DNA Polimerase termostabil dari bakteri termofilik isolat lokal *Disertasi*, Dep. Kimia, FMIPA, ITB.
- Tika. I N. dan Ngadiran K. 2006. Isolasi dan Identifikasi bakteri termofilik dari Sumber Air Panas di provinsi Bali. *Proseding seminar Kimia Nasional (SENAKI) VII*. ITS, Surabaya
- Tika, I N. dan I N.Selamat, 2008. Pembuatan Elektroda Enzim Untuk Biosensor dengan Modifikasi Lipase termostabil Isolat Banyuwedang yang diamobil dengan PVC, *Proseding Seminar Kimia Nasional, UNS* 2008.
- Tika, I N, W. Redhana, N.Pt. Ristiati, 2007. Isolasi , Pemurnian dan Karakterisasi Lipase Termostabil dari Bakteri termofilik Yang diisolasi dari Sumber air Panas Banyuwedang , Keamatan Gerogak Buleleng Bali. *Dikti*, 2007.
- Tika, I N. dan I N.Selamat, 2008. Penggunaan Lipase termostabil Isolat Banyuwedang Untuk Biosensor Dalam Penentuan Gliserida Pada Serum Darah. *Laporan Hibah Bersaing Tahun I, Dikti*.2008

