



UNIVERSITAS SURABAYA
LEMBAGA PENELITIAN DAN PENGABDIAN KEPADA MASYARAKAT

GEDUNG PERPUSTAKAAN Lt. 4
JALAN RAYA KALIRUNGKUT (TENGGILIS), SURABAYA, 60293
TELP. (031) 2981360, 2981365 FAX. (031) 2981373

SURAT TUGAS

Nomor : 026/Lit/LPPM-01/MIPA/XII/2012

Atas dasar proposal penelitian lanjut dari MIPA dengan ini Ketua Lembaga Penelitian dan Pengabdian Kepada Masyarakat Universitas Surabaya memberi tugas kepada :

1. Restu Kartiko Widi, S.Si., M.Si., Ph.D. ✓
2. Drs. Heru Arwoko, M.Si.
3. Arief Budhyantoro, S.Si., M.Si.

Untuk melaksanakan penelitian sesuai proposal dengan judul:

Pembuatan Set Alat Uji Biosensor Berbasis Enzim Glukose Oxidase Terimobil Pada Bentonit Termodifikasi.

Dengan waktu pelaksanaan penelitian selama 12 bulan (sesuai proposal) terhitung mulai tanggal 22 Desember 2012 sampai dengan 21 Desember 2013, dengan biaya penelitian sebesar Rp 30.000.000,- (Tiga puluh juta rupiah) dengan rincian terlampir dan hasil akhir diwujudkan:

1. Print out laporan hasil penelitian (+ CD *soft copy*)
2. Ringkasan hasil penelitian atau abstraksi penelitian (untuk database)
3. Hasil penelitian wajib dipublikasikan di jurnal terakreditasi.

Demikian untuk dilaksanakan sebaik-baiknya.

Mengetahui



Nemuel Daniel Pah, S.T., M.Eng., Ph.D.
Wakil Rektor I

Surabaya, 22 Desember 2012



Dr. Yoan Nursari Simanjuntak, SH., M.Hum.
Ketua LPPM

Tembusan :

1. Ketua Departemen MIPA Ubaya,
2. Direktur Keuangan Ubaya,
3. Kepala Biro Adpesdam Ubaya,
4. Yang bersangkutan

HALAMAN PENGESAHAN

1. a. Judul Penelitian : Pembuatan Set Alat Uji Biosensor Berbasis Enzim Glukose Oxidase Terimobil Pada Bentonit
b. Bidang Ilmu : Termodifikasi Sains
2. Ketua Peneliti
a. Nama Lengkap : Restu Kartiko Widi, S.Si., M.Si., Ph.D
b. Jenis Kelamin : Laki-laki
c. Gol/pangkat/NPK : IVa/Lektor Kepala/199024
d. Jab. fungsional : Penata
e. Jab. struktural : -
f. Fakultas/jurusan : Dep. MIPA
g. Telp/Faks : 031-2981398
h. email : restu@ubaya.ac.id
3. Jumlah anggota peneliti : 2 orang
a. Nama Anggota Peneliti : Drs. Heru Arwoko, M.si.
Arief Budhyantoro, S.Si., M.Si.
4. Lokasi Penelitian : Lab. Kimia Universitas Surabaya
5. Kerjasama dengan Institusi lain : -
6. Lama Penelitian : 12 bulan
7. Waktu Penelitian : Desember 2012 s.d. Desember 2013
8. Biaya yang diperlukan : Rp. 30.000.000,-
9. Sumber Dana
a. Sumber dari Depdiknas : -
b. Sumber dari Univ. Surabaya : Rp. 30.000.000,-
c. Sumber lain : -
Jumlah : Rp. 30.000.000,-

Surabaya, 14 Nopember 2013

Sesungguhnya,
Ketua Departemen MIPA

(Dr. Hazrul Iswadi)
NPK: 200006

Ketua Peneliti,

(Restu Kartiko Widi, S.Si., M.Si., Ph.D)
NPK: 199024

Menyetujui,
Ketua Lembaga Penelitian dan Pengabdian Kepada Masyarakat
Universitas Surabaya

Dr. Yean Nursari Simanjuntak, S.H., M.Hum
NPK: 196008

ini telah didokumentasikan
di Perpustakaan UBAYA



LP 156 77
Ellesef Tugan, M.Eng, Ph.D



**LAPORAN
PENELITIAN LANJUT**

**PEMBUATAN SET ALAT UJI BIOSENSOR BERBASIS
ENZIM GLUKOSE OKSIDASE TERIMOBIL PADA
BENTONIT TERMODIFIKASI**

Oleh:

**Restu Kartiko Widi, S.Si., M.Si., Ph.D
Drs. Heru Arwoko, M.si.
Arief Budhyantoro, S.Si., M.Si.**

**Departemen MIPA
Universitas Surabaya**

Nopember 2013

HALAMAN PENGESAHAN

1. a. Judul Penelitian : Pembuatan Set Alat Uji Biosensor Berbasis Enzim Glukose Oxidase Terimobil Pada Bentonit
- b. Bidang Ilmu : Termodifikasi Sains
2. Ketua Peneliti
 - a. Nama Lengkap : Restu Kartiko Widi, S.Si., M.Si., Ph.D
 - b. Jenis Kelamin : Laki-laki
 - c. Gol/pangkat/NPK : IVa/Lektor Kepala/199024
 - d. Jab. fungsional : Penata
 - e. Jab. struktural : -
 - f. Fakultas/jurusan : Dep. MIPA
 - g. Telp/Faks : 031-2981398
 - h. email : restu@ubaya.ac.id
3. Jumlah anggota peneliti : 2 orang
 - a. Nama Anggota Peneliti : Drs. Heru Arwoko, M.si.
Arief Budhyantoro, S.Si., M.Si.
4. Lokasi Penelitian : Lab. Kimia Universitas Surabaya
5. Kerjasama dengan Institusi lain : -
6. Lama Penelitian : 12 bulan
7. Waktu Penelitian : Desember 2012 s.d. Desember 2013
8. Biaya yang diperlukan : Rp. 30.000.000,-
9. Sumber Dana
 - a. Sumber dari Depdiknas : -
 - b. Sumber dari Univ. Surabaya : Rp. 30.000.000,-
 - c. Sumber lain : -Jumlah : Rp. 30.000.000,-

Surabaya, 14 Nopember 2013

Mengetahui,
Ketua Departemen MIPA

Ketua Peneliti,

(Dr. Hazrul Iswadi)
NPK: 200006

(Restu Kartiko Widi, S.Si., M.Si., Ph.D)
NPK: 199024

Menyetujui,
Ketua Lembaga Penelitian dan Pengabdian Kepada Masyarakat
Universitas Surabaya

Dr. Yoan Nursari Simanjuntak, SH, MHum
NPK: 196008

A. JUDUL PENELITIAN

Pembuatan Set Alat Uji Biosensor Berbasis Enzim Glukose Oksidase Terimobil Pada Bentonit Termodifikasi

B. BIDANG ILMU:

Sains

C. ABSTRAK

Pada penelitian ini dilakukan pembuatan wafer enzim glukosa oksidase (GOD) terimobilisasi pada Ca-bentonit termodifikasi sebagai rancangan dasar biosensor glukosa darah. Modifikasi dilakukan dengan penambahan 2 jenis bahan yaitu melalui metode pengasaman dengan penambahan HCl serta melalui penambahan surfaktan *Tetramethylammonium Hydroxide* (TMAOH) 5%. Wafer enzim ini terdiri dari lapisan membran selulosa asetat dan lapisan wafer enzim GOD terimobilisasi pada Ca-bentonit termodifikasi asam|PAH. Pengaruh konsentrasi selulosa asetat, konsentrasi *polyallylamine hydrochloride* (PAH) dan keakuratan pembacaan rancangan alat telah diselidiki dalam penelitian ini. Signal elektrokimia wafer enzim yang ditimbulkan oleh elektron yang dihasilkan dari reaksi enzimatik akan dibaca oleh alat LCR meter sebagai nilai kapasitansi. Hasil penelitian menunjukkan konsentrasi selulosa asetat hingga 2% (w/v) tidak menghalangi substrat glukosa untuk melewati membran, mengakibatkan jumlah pori-pori membran menjadi semakin berkurang dan semakin rapat, serta terdapat perbedaan penampakan antar variasi konsentrasinya. Penambahan polimer PAH dengan berbagai perbandingan rasio konsentrasi dalam pembuatan lapisan wafer enzim GOD terimobilisasi pada Ca-bentonit termodifikasi asam|PAH dan TMAOH|PAH tidak mempengaruhi aktivitas wafer enzim baik diukur dengan metode spektrofotometri (metode DNS) maupun menggunakan rancangan alat untuk pengukuran nilai kapasitansinya. Interaksi antara Ca-bentonit yang mengimobilisasi enzim GOD dan PAH ditunjukkan dengan perubahan spektra FTIR, yaitu munculnya serapan di daerah 1460 cm^{-1} dan 1540 cm^{-1} setelah penambahan PAH. Rancangan alat yang dibuat dalam penelitian ini masih perlu penyempurnaan lebih lanjut.

Kata Kunci: *Glukosa Oksidase, Ca-Bentonit, Polyallylamine Hydrochloride/PAH, Membran Selulosa Asetat.*

D. PENDAHULUAN

1. Latar Belakang

Enzim sudah tidak diragukan memiliki peran yang sangat penting dalam kehidupan. Enzim mempunyai sifat yang potensial untuk dimanfaatkan, antara lain daya katalitiknya yang besar dan spesifitasnya terhadap substrat dari reaksi yang dikatalisisnya (Lehninger, 1990). Enzim menjadi primadona industri saat ini dan di masa yang akan datang karena melalui penggunaannya, energi dapat dihemat dan ramah dengan lingkungan karena tidak menghasilkan produk samping yang berbahaya seperti pada penggunaan zat kimia tertentu.

Enzim glukosa oksidase (GOD) (EC 1.1.3.4) adalah suatu oksido-reduktase yang mengkatalisis oksidasi glukosa menjadi hidrogen peroksida dan D-glucono- δ -lactone. Pemanfaatan enzim GOD terus berkembang baik dalam bidang industri maupun dalam bidang medis. Glukosa oksidase digunakan secara luas untuk determinasi keberadaan glukosa bebas dalam darah (reagen pendiagnosa penyakit), biosensor, sebagai zat aditif pada industri makanan, produksi asam glukonat, sebagai bahan tambahan dalam pasta gigi dan pembuatan roti. (Vroemen, 2003; Raba and Motolla, 1995).

Dalam penggunaannya, seringkali enzim diimobilisasi agar tidak terbawa dalam hasil reaksi dan mudah dipisahkan dari hasil reaksi sehingga dapat dipergunakan lagi.

Salah satu material yang memiliki potensi untuk digunakan sebagai bahan imobilisasi enzim adalah bentonit mengingat bahwa bentonit memiliki karakteristik yang sesuai dengan material imobilisator dan terdapat melimpah di Indonesia. Bentonit adalah salah satu jenis lempung (*clay*) yang merupakan polimer silika-alumina yang tersusun atas struktur lapisan-lapisan. Indonesia merupakan salah satu sumber dan sekaligus konsumen bentonit yang cukup besar. Pada penelitian terdahulu (Restu dkk, 2012) telah berhasil ditunjukkan bahwa enzim GOD dapat diimobilisasi menggunakan bentonit dan tetap menunjukkan aktifitas yang cukup baik.

Pada penggunaan enzim GOD di bidang kesehatan, enzim tersebut digunakan sebagai pendeteksi gula darah melalui mekanisme reaksi redoks dan memanfaatkannya sebagai biosensor. Beberapa penelitian yang memanfaatkan enzim GOD sebagai biosensor yang dikaitkan dengan elektrode adalah berdasarkan pembuatan film elektropolimerisasi yang mengandung GOD. Seperti penggunaan poly(3-amino phenol), poly(1,3-diaminobenzena), polyphenol, polyaniline, polyacetylene, polyindole dan polypirrole dalam pembuatan biosensor berbasis GOD (Nakabayshi et al, 1998; Chung et al, 2001; Gerard et al, 2002; Yuqing et al, 2006).

Kebanyakan penelitian terkait pemanfaatan GOD sebagai biosensor, menggunakan polimer sebagai bahan pengimobilnya. Berdasarkan hal tersebut usulan penelitian ini dimaksudkan untuk mengkaji metode imobilisasi enzim GOD menggunakan bentonit alam Indonesia dan memanfaatkannya sebagai biosensor kadar glukosa. Jenis bentonit yang melimpah di Indonesia adalah Ca-bentonit. Jenis ini mengandung kalsium (Ca) dan magnesium (Mg) lebih banyak dibandingkan natriumnya, mempunyai sifat sedikit menyerap air sehingga apabila didispersikan dalam air akan cepat mengendap (tidak membentuk suspensi), pH nya berkisar 4,0 – 7,0 (bersifat asam), dan memiliki daya tukar ion cukup besar. Jenis bentonit ini juga memiliki daya tekan yang cukup besar. Diharapkan bentonit Indonesia ini mampu menjadi bahan pengimobil yang baik serta mampu menyimpan elektron dengan baik sehingga dapat meningkatkan kapasitansi sensor yang dipersiapkan. Hal yang juga menjadi fokus kajian adalah pembuatan set peralatan elektronik untuk menentukan kadar glukosa hasil proses aktifitas enzim GOD dalam biosensor.

Material bentonit dipreparasi melalui proses pengasaman dan interkalasi menggunakan kation organik (*surfactant*). Selanjutnya dipersiapkan proses pembuatan biosensor dengan melapiskan enzim GOD yang telah terimobilisasi bentonit pada polimer serta menutupnya dengan lapisan selulosa asetat yang berfungsi sebagai membran agar hanya senyawa glukosa yang dapat masuk dan dikatalisis oleh enzim GOD. Uji aktifitas biosensor enzim akan dilakukan menggunakan set peralatan elektronik yang dirancang dan dipersiapkan peneliti. Peralatan tersebut didasarkan pada nilai induktansi yang dihasilkan oleh reaksi enzimatik pada biosensor. Induktansi adalah sifat dari rangkaian elektronika yang menyebabkan timbulnya potensial listrik secara proporsional terhadap arus yang mengalir pada rangkaian tersebut, sifat ini disebut sebagai induktansi sendiri. Sedangkan apabila potensial listrik dalam suatu rangkaian ditimbulkan oleh perubahan arus dari rangkaian lain disebut sebagai induktansi bersama.

2. Perumusan Masalah

Penelitian ini dimaksudkan untuk studi awal pembuatan biosensor berbasis enzim glukose oksidase dan mempersiapkan set peralatan elektronik untuk membaca hasil aktifitas biosensor. Sebelum dibuat biosensor, terlebih dahulu enzim GOD diimobilisasi pada bentonit yang telah dimodifikasi dengan pengasaman dan interkalasi menggunakan surfaktan. Proses modifikasi bentonit melalui interkalasi dimaksudkan untuk meningkatkan ukuran pori bentonit mengingat bahwa penjerapan enzim GOD dalam proses imobilisasi

enzim mengambil tempat di permukaan bentonit (baik permukaan luar maupun permukaan di dalam pori), sehingga ukuran pori diupayakan agar dapat dimasuki oleh molekul enzim GOD. Proses pengasaman dimaksudkan untuk meningkatkan muatan positif permukaan bentonit. Pada usulan penelitian ini bahan penginterkalasi dibatasi pada surfaktan Trimethylammonium hidroksida (TMA-OH), bahan pengasam adalah asam klorida dan enzim yang digunakan dibatasi pada enzim Glucose Oxidase (GOD). Setelah enzim diimobilisasi, selanjutnya dilapiskan pada permukaan polimer PAH, dan diselimuti dengan selulosa asetat.

Pendekatan yang digunakan sebagai kerangka penyusunan konseptual dalam penelitian ini adalah sebagai berikut:

(i) Proses interkalasi yang dimaksudkan untuk meningkatkan jarak antar lapisan lempung menjadi lebih besar (membentuk pori berukuran meso 20-60 Å) dengan molekul organik (kationik, anionik dan non ionik molekul), didasarkan pada penelitian yang telah dilakukan oleh Polverejan, 2000; Khaorapapong *et.al.*, 2002; He *et. al.*, 2004; Davis *et.al.*, 2004; Slade and Gates, 2004; Arief, dkk, 2007; Restu dan Arief, 2007. Proses pengasaman dimaksudkan untuk menjadikan permukaan bentonit menjadi lebih bermuatan positif sehingga diharapkan memiliki kemampuan mengikat enzim dengan lebih baik dalam proses imobilisasinya.

(ii) Penggunaan polimer diharapkan mampu membantu menghantarkan elektron yang dihasilkan selama proses enzimatik menuju ke elektroda.

(iii) penggunaan selulosa asetat diharapkan mampu bertindak sebagai membran yang membatasi hanya glukosa yang dapat masuk dalam lapisan enzim GOD sehingga reaksi enzimatik dapat berjalan tanpa ada gangguan pengotor senyawa lain.

(iv) Set peralatan uji dibuat berbasis nilai induktansi atau kapasitansi yang dihasilkan selama reaksi enzimatik substrat oleh enzim GOD dalam biosensor

Berdasarkan uraian di atas, maka perumusan masalah yang diusulkan adalah sebagai berikut:

1. apakah penggunaan enzim GOD terimobilisasi pada bentonit, polimer PAH dan selulosa asetat dapat menjadi material biosensor berbasis enzim GOD?
2. apakah set peralatan uji yang telah dibuat mampu menunjukkan bacaan aktifitas biosensor?

3. Tujuan Penelitian

Secara umum usulan penelitian ini bertujuan untuk: (i) Mempelajari metode pembuatan biosensor berbasis enzim GOD (ii) Mengkarakterisasi dan menganalisa biosensor berbasis enzim GOD. (iii) Melakukan uji aktivitas katalisis biosensor berbasis enzim GOD menggunakan set peralatan elektronik yang telah dirancang

4. Manfaat Penelitian

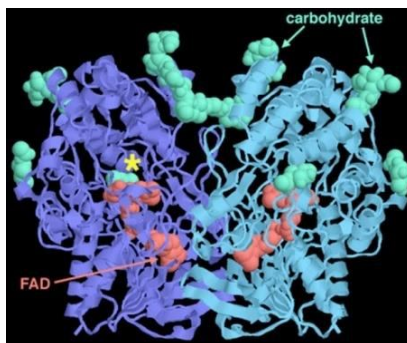
Usulan penelitian ini diyakini sangat penting dan memberikan manfaat yang besar karena menggunakan bahan dasar dari bahan alam yang ada di Indonesia sehingga mampu memberikan nilai tambah terhadap bahan alam yang melimpah di Indonesia. Secara keseluruhan manfaat yang dapat disumbangkan melalui penelitian ini adalah: (i) diperolehnya teknologi sintesis biosensor; (ii) mendorong peningkatan ilmu pengetahuan dan teknologi terutama di bidang nanomaterial di Indonesia; (iii) diharapkan hasil penelitian ini segera dapat diterapkan untuk proses imobilisasi enzim dan aplikasi untuk bidang kesehatan. Lebih khusus penelitian ini juga diharapkan mampu menghidupkan suasana ilmiah di dunia pendidikan di Universitas Surabaya pada khususnya dan tingkat

nasional pada umumnya, sehingga Ubaya dapat berperan serta dalam pengembangan bidang nanoteknologi dan biologi di Indonesia.

D. Tinjauan Pustaka

Enzim GOD (EC 1.1.3.4) termasuk ke dalam enzim oksidoreduktase yang berfungsi untuk mengkatalisis reaksi oksidasi β -D-glukosa menjadi asam glukonat dengan menggunakan molekul oksigen sebagai akseptor elektron. Enzim ini banyak diproduksi oleh jamur *Aspergillus niger* dan *Penicillium* yang didistribusikan diantara membran ekstrasellular di sekitar dinding sel fungi (Agustanti, 2008).

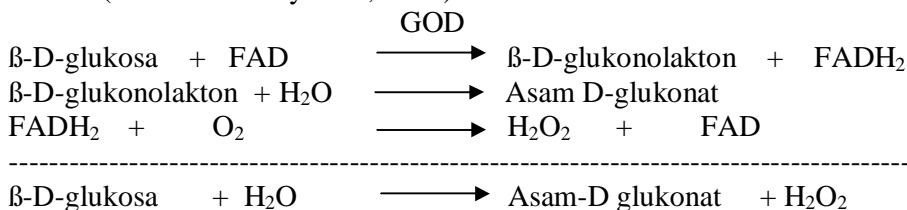
Glukosa oksidase adalah suatu protein dimer yang tersusun atas dua subunit identik. Setiap subunit atau monomer melipat menjadi dua domain, yaitu satu domain mengikat substrat β -D-glukosa dan domain lainnya mengikat secara non kovalen kofaktor Flavin Adenin Dinukleotida (FAD), yang digunakan sebagai agen pengoksidasi. FAD merupakan komponen umum dalam sistem biologis untuk reaksi oksidasi-reduksi (redoks) (McDowall, 2006).



Gambar 1. Struktur GOD.
Sumber: <http://www.rcsb.org/pdb>

Reaksi oksidasi glukosa oleh enzim GOD dilakukan oleh kofaktor FAD yang terikat jauh di dalam enzim, pada gambar 1 ditunjukkan dengan warna merah. Sisi aktif dimana glukosa berikatan dengan enzim terletak di atas kofaktor FAD, yang ditunjukkan pada suatu kantung dengan tanda bintang. Melihat bahwa enzim, seperti protein pada umumnya yang bertindak diluar sel, enzim ini ditutupi oleh rantai karbohidrat (ditunjukkan dengan warna hijau pada Gambar 1) (Goodsell, 2006). Sisi aktif dari enzim glukosa oksidase mengandung tiga asam amino penting yang terlibat dalam katalisis, yaitu His516, Glu412 yang berikatan hidrogen dengan His559 (McDowall, 2006).

Reaksi oksidasi β -D-glukosa oleh enzim glukosa oksidase dapat dituliskan sebagai berikut (Firman dan Aryantha, 2003):

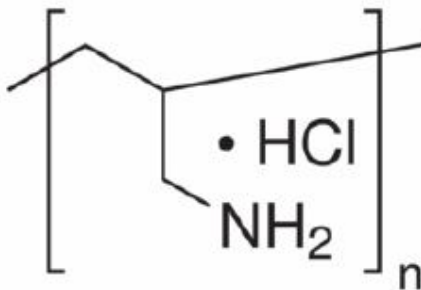


Fakta bahwa glukosa oksidase (GOD) hanya menggunakan β -glukosa sebagai substrat bukan berarti bahwa glukosa hanya dapat dioksidasi sebagian. Selama proses, α -glukosa akan bermutarotasi secara spontan menjadi α -, β -glukosa, membuat semua glukosa dapat digunakan sebagai substrat. Glukosa oksidase cukup spesifik untuk glukosa, dimana hanya terdapat <1% aktivitas terhadap gula lain seperti xylosa dan galaktosa. Selain itu, aktivitas

terhadap gula mono- dan disakarida alami lain juga sangat rendah (Vroemen, 2003). Enzim glukosa oksidase (GOD), baik yang diperoleh dari *Penicillium* maupun *Aspergillus* menunjukkan kurva aktivitas terjadi pada pH 4,5-7,5 dan pada suhu 30°C-60° C. Hampir tidak ada aktivitas dari GOD pada pH < 3,0 dan pH > 8,5. GOD dapat distabilkan oleh konsentrasi glukosa. Hal ini menjelaskan mengapa pada beberapa aplikasi dengan pH 2,5-3,0 dan konsentrasi glukosa yang tinggi, enzim ini masih memiliki aktivitas. Pada pH > 8 stabilitas enzim dapat ditingkatkan dengan penambahan substrat. Pada suhu di atas 60oC, aktivitas GOD menunjukkan penurunan secara perlahan dan pada suhu 70oC masih tersisa 10% aktivitas GOD. Sedangkan pada suhu 80oC GOD mengalami inaktivasi (Vroemen, 2003).

Ca-bentonit yang telah dimodifikasi menggunakan asam dapat digunakan sebagai matriks imobilisasi enzim glukosa oksidase (GOD). Modifikasi terbaik ditunjukkan pada modifikasi dengan HCL 1 M hingga 2 M. Enzim GOD terikat pada bentonit melalui ikatan ionik. pH terbaik GOD terimobilisasi pada bentonit termodifikasi asam adalah 5,5 hingga 7 dan suhu terbaik adalah 30oC hingga 40°C. Nilai Km dan Vmax dari enzim GOD terimobilisasi bentonit termodifikasi asam mengalami penurunan ±1/2 kali dari nilai Km dan Vmax dari enzim bebas.

Polimer nanopartikel menjadi perhatian khusus dalam dunia medis. Polialilamin hidrokolida (*Polyallylamine hydrochloride/PAH*) adalah suatu polielektrolit kationik yang dibuat dari polimerisasi *allylamine*.

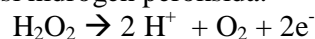


Gambar 2. Struktur molekul *Polyallylamine hydrochloride/PAH*.

Dalam biosensor, *conducting* polimer berfungsi sebagai transduser yang mengubah signal biologis menjadi signal elektrik (Arshak *et al*, 2009).

Selulosa asetat merupakan senyawa yang relatif bersifat inert dan tidak berinteraksi dengan suatu protein, sehingga cocok digunakan sebagai komponen pendukung dalam pembuatan media. Selulosa asetat telah banyak dimanfaatkan baik sebagai penghalang selektif (*selective barrier*) serta untuk meningkatkan biokompatibilitas dalam sensor elektrokimia. Lapisan selulosa asetat hanya memungkinkan molekul kecil untuk mencapai elektroda dan dapat mengeliminasi banyak senyawa elektrokimia-aktif yang bisa mengganggu pengukuran (Davis dan Higson, 2007).

Salah satu metode yang sangat sensitive dan akurat untuk menentukan aktivitas enzim glukosa oksidase adalah berdasarkan produksi hidrogen peroksida. Jumlah hidrogen peroksida dapat ditentukan secara langsung melalui metode amperometrik yaitu mengukur arus atau tegangan yang dihasilkan oleh aliran elektron yang dilepaskan selama proses oksidasi hidrogen peroksida.



Pada dasarnya biosensor terdiri dari tiga unsur yaitu unsur biologi (reseptor biologi), transduser, dan sistem elektronik pemroses sinyal. Unsur biologi yang umumnya digunakan dalam mendesain suatu biosensor dapat berupa enzim, organel, jaringan, antibodi, bakteri, jasad renik, dan DNA. Unsur biologi ini biasanya berada dalam bentuk terimmobilisasi pada suatu transduser. Immobilisasi sendiri dapat dilakukan dengan berbagai cara baik dengan (1) adsorpsi fisik, (2) dengan menggunakan membran atau perangkap matriks atau (3) dengan membuat ikatan kovalen antara biomolekul dengan transduser.

Untuk transduser, yang banyak digunakan dalam suatu biosensor adalah transduser elektrokimia, optoelektronik, kristal piezoelektronik, *field effect* transistor dan temistor. Proses yang terjadi dalam transduser dapat berupa *calorimetric* biosensor, *potentiometric* biosensor, *amperometric* biosensor, *optical* biosensor maupun *piezo-electric* biosensor. Sinyal yang keluar dari transduser ini kemudian di proses dalam suatu sistem elektronik misalnya *recorder* atau komputer.

Beberapa penelitian pendahuluan yang telah dikerjakan oleh tim peneliti untuk menunjang penelitian ini secara langsung adalah: Pillarisasi bentonit alam menggunakan logam Al dan Fe dan aplikasinya sebagai katalis (Arief dkk, 2004); Modifikasi zeolit alam menggunakan surfaktan HDTMA dan aplikasinya dalam proses adsorpsi fenol dalam sistem larutan (Arief dkk. 2004); Pillarisasi dan karakterisasi struktur bentonit alam-surfaktan terpillar logam Al, Fe dan campuran logam Al-Fe (2005), serta pemanfaatannya sebagai katalis hidrosilasi fenol (2006), sebagai adsorben ion Cr (Arief, dkk, 2007), sebagai adsorben ion Cu (Restu dan Arief, 2007), dan sebagai katalis reaksi esterifikasi asam lemak (Restu dan Arief, 2009), studi imobilisasi enzim GOD pada bentonit termodifikasi (Restu, Arief, Ruth, 2012).

E. METODE PENELITIAN

Penelitian ini dimulai dengan pembuatan matriks biosensor yang terdiri dari lapisan polimer *Polyallylamine hydrochloride* (PAH), enzim glukosa oksidase (GOD), dan selulosa asetat. Pada bagian ini, enzim GOD terlebih dahulu diimmobilisasi pada bentonit termodifikasi melalui pengasaman dan interkalasi TMA-OH (Tri Methyl Ammonium Hidroksida). Matriks yang diperoleh dikarakterisasi menggunakan FT-IR. Tahap selanjutnya adalah pembuatan set peralatan elektronik transduser berbasis elektrokimia untuk uji aktifitas biosensor.

Variabel yang digunakan dalam penelitian ini antara lain: variabel konsentrasi selulosa asetat, variabel perbandingan rasio konsentrasi antara enzim GOD terimmobilisasi pada Ca-bentonit termodifikasi asam atau surfaktan dengan polimer PAH, dan keakuratan pembacaan nilai kapasitansi dari rancangan alat.

Pada variabel konsentrasi selulosa asetat, variasi konsentrasi selulosa asetat yang digunakan antara lain: 0,5%, 1%, 1,5%, dan 2%. Parameter yang diukur dari pengaruh variasi konsentrasi selulosa asetat adalah kemampuan substrat melewati membran, penampakan mikroskopis dan makroskopis dari membran yang dihasilkan.

Selain itu juga terdapat variabel perbandingan rasio konsentrasi antara enzim GOD terimmobilisasi pada Ca-bentonit termodifikasi asam dengan polimer PAH, dimana perbandingan rasio konsentrasi yang digunakan yaitu 1:0, 1:1, 1:2, dan 1:3. Parameter yang diukur dari pengaruh perbandingan rasio konsentrasi antara enzim GOD terimmobilisasi pada Ca-bentonit termodifikasi asam dan polimer PAH adalah aktivitas enzim yang diukur dengan metode spektrofotometri (DNS) dan nilai kapasitansi yang terbaca oleh alat LCR meter.

Untuk mengetahui keakuratan pembacaan nilai kapasitansi dari rancangan alat yang dibuat maka akan dilakukan pengujian kerja alat menggunakan beberapa senyawa yang terlibat dalam

reaksi enzimatik dan dilakukan juga uji menggunakan variasi konsentrasi glukosa. Parameter yang diukur dalam tahapan ini adalah nilai kapasitansi yang terbaca oleh alat LCR meter.

Tahapan pada penelitian ini akan dibagi menjadi 3 tahap utama, yaitu pembuatan lapisan membran selulosa asetat, pembuatan lapisan wafer enzim GOD terimobilisasi pada Ca-bentonit termodifikasi asam|PAH atau surfaktan|PAH, dan penggunaan rancangan alat yang terhubung dengan LCR meter.

1. Pembuatan Lapisan Membran Selulosa Asetat

Membran selulosa asetat dibuat dengan berbagai variasi konsentrasi, yaitu 0,5%, 1%, 1,5% dan 2%. Pembuatan membran selulosa asetat dilakukan dengan cara mencampurkan (0,05, 0,1, 0,15, dan 0,2) gram bubuk selulosa asetat ke dalam campuran larutan aseton:kloroform = 4:1 (8 mL aseton + 2 mL kloroform) pada tabung reaksi. Kemudian larutan divortex hingga bubuk selulosa asetat benar-benar larut. Larutan tersebut kemudian dituangkan dibagian tengah cawan Petri dan dibiarkan hingga pelarut aseton+kloroform menguap sehingga nantinya akan membentuk formasi membran selulosa asetat. Parameter pengukuran untuk mengetahui kemampuan substrat melewati membran dilakukan dengan cara menyaring substrat glukosa konsentrasi 500 ppm menggunakan membran yang dihasilkan dari setiap variasi konsentrasi dan filtrat yang didapatkan kemudian dilakukan uji menggunakan metode DNS. Penampakan mikroskopis membran akan diukur dengan melihat penampakan/jumlah pori-pori membran selulosa asetat pada mikroskop dengan perbesaran 1000x. Pengamatan terhadap penampakan makroskopis dari membran yang dihasilkan dilakukan dengan melihat penampakannya secara kasat mata.

2. Pembuatan Lapisan Wafer Enzim GOD Terimobilisasi pada Ca-Bentonit Termodifikasi |PAH

2.1. Modifikasi Ca-Bentonit dengan HCl

Sebanyak 5 gram Ca-bentonit berukuran 140 mesh dicampur dengan 100 mL HCl 2 M. Campuran Ca-bentonit dan HCl direfluks pada suhu 90°C selama 1 jam. Hasil refluks kemudian diaduk menggunakan *magnetic stirrer* pada suhu ruang selama 24 jam dan dicuci dengan aquadest hingga pH netral/pH aquadest (pengecekan pH dilakukan dengan menggunakan pH *indicator universal*). Ca-bentonit termodifikasi asam yang telah selesai dicuci kemudian disaring dengan menggunakan corong Buchner dan dikeringkan dalam oven pada suhu 100°C hingga kering. Ca-bentonit termodifikasi asam yang telah dikeringkan kemudian digunakan untuk imobilisasi enzim GOD.

2.2. Modifikasi Ca-bentonit dengan Surfaktan

Modifikasi Ca-bentonit menggunakan surfaktan jenis TMAOH (Tetrametilammonium Hidroksida). Ca-bentonit yang digunakan terlebih dahuludiyak dengan ayakan 140 mesh. Interkalasi dilakukan dengan mencampur larutan surfaktan TMAOH dan suspensi Ca-bentonit, dimana rasio Ca-bentonit : larutan surfaktan = 5 gr : 250 ml, sedangkan konsentrasi surfaktan TMAOH yang digunakan adalah 5% (v/v) (Wuisan, 2012). Surfaktan dimasukkan ke dalam labu alas bulat dan dipanaskan sampai suhu 75°C disertai pengadukan. Setelah suhu mencapai 75°C, dilakukan penambahan Ca-bentonit secara perlahan-lahan dan dijaga agar suhunya tidak turun drastis. Selanjutnya, dilakukan refluks selama 5 jam. Hasil interkalasi dibilas dengan akuades hingga pH netral, lalu disaring dengan corong *buchner* dan dikeringkan dalam oven pada suhu 100°C hingga kering.

2.3. Imobilisasi GOD pada Ca-Bentonit Termodifikasi

Sebanyak 950 mg Ca-bentonit termodifikasi asam ditambahkan dengan 33,25 mL larutan enzim GOD konsentrasi 42,86 U/mL. Campuran diaduk dengan *stirrer* pada suhu ruang dan dilakukan pengukuran persentase GOD terimobilisasi pada jam ke-24 (imobilisasi 24 jam) dan pada jam ke-48 (imobilisasi 48 jam). Setelah imobilisasi selesai dilakukan, larutan enzim berisi Ca-bentonit termodifikasi asam kemudian disentrifuge dengan kecepatan 4000 rpm selama 60

menit pada suhu 4°C. Untuk mengetahui persentase GOD terimobilisasi pada Ca-bentonit termodifikasi asam maka dilakukan pengukuran konsentrasi GOD awal sebelum diimobilisasi dan pengukuran konsentrasi GOD pada supernatan setelah dilakukan proses imobilisasi. Metode pengukuran konsentrasi GOD dilakukan dengan metode Hartree Lowry. Pellet yang didapatkan dicuci dengan 10 mL buffer fosfat 0,1 M pH 7 dan disentrifuge kembali. Supernatan hasil cucian diuji kembali dengan metode Hartree Lowry. Pellet hasil cucian kemudian dilarutkan kembali ke dalam 33,25 mL buffer fosfat 0,1 M pH 7 dan disimpan untuk tahap selanjutnya.

2.4. Uji Aktivitas Enzim GOD Bebas dan Enzim GOD Terimobilisasi pada Ca-Bentonit Termodifikasi dengan Metode DNS

Sebanyak 100 µL larutan enzim GOD terimobilisasi pada Ca-bentonit termodifikasi asam dan 500 µL substrat glukosa konsentrasi 1000 ppm dipreinkubasi selama 10 menit pada suhu 30°C. Setelah itu kedua larutan dicampurkan dan diinkubasi selama 30 menit pada suhu 30°C. Setelah proses inkubasi selesai, campuran disentrifuge dengan kecepatan 13000 rpm pada suhu 4°C selama 7 menit. Supernatan yang didapatkan kemudian diambil sebanyak 500 µL dan direaksikan dengan 500 µL reagen DNS. Campuran ini selanjutnya dipanaskan selama 5-15 menit pada suhu >90°C. Setelah selesai dipanaskan kemudian ke dalam campuran ditambahkan 167 µL larutan K-Na-tartart 40% dan didinginkan hingga mencapai suhu ruang. Absorbansi konsentrasi glukosa sisa kemudian diukur pada λ 575 nm.

2.5. Pembuatan Lapisan Wafer Enzim GOD Terimobilisasi pada Ca-Bentonit Termodifikasi dengan PAH Berbagai Perbandingan Rasio Konsentrasi

Rasio konsentrasi antara GOD terimobilisasi pada Ca-bentonit termodifikasi asam atau surfaktan dan PAH yang digunakan dalam penelitian ini yaitu 1:0, 1:1, 1:2, dan 1:3. Sebagai contoh untuk pembuatan lapisan dengan rasio 1:0, maka sebanyak 300 µL larutan GOD terimobilisasi pada Ca-bentonit termodifikasi asam ditambahkan dengan 0 µL larutan PAH konsentrasi 5 mg/mL (pelarut PAH yang digunakan adalah aquabides). Untuk pembuatan lapisan dengan rasio 1:1, maka sebanyak 300 µL larutan GOD terimobilisasi pada Ca-bentonit termodifikasi asam ditambahkan dengan 300 µL larutan PAH konsentrasi 5 mg/mL dan demikian seterusnya untuk variasi yang lain. Campuran kemudian dihomogenkan dan dibiarkan selama 2 jam pada suhu ruang. Setelah itu campuran disentrifuge dengan kecepatan 13000 rpm selama 7 menit pada suhu 4°C. Supernatan hasil sentrifuge dibuang dan pellet yang didapatkan kemudian dilarutkan kembali dalam 300 µL buffer fosfat 0,1 M pH 7 untuk kemudian digunakan dalam uji aktivitas dengan menggunakan metode DNS dan pengukuran nilai kapasitansi menggunakan alat LCR meter.

2.6. Uji Pengaruh Penambahan PAH Terhadap Aktivitas Wafer Enzim GOD Terimobilisasi pada Ca-Bentonit Termodifikasi Asam|PAH (Metode DNS)

Sebanyak 100 µL larutan wafer enzim GOD terimobilisasi pada Ca-bentonit termodifikasi asam|PAH (1:0, 1:1, 1:2, dan 1:3) dan 500 µL substrat glukosa konsentrasi 1000 ppm dipreinkubasi selama 10 menit pada suhu 30°C. Setelah itu kedua larutan dicampurkan dan kemudian diinkubasi selama 30 menit pada suhu 30°C. Setelah proses inkubasi selesai, campuran disentrifuge dengan kecepatan 13000 rpm pada suhu 4°C selama 7 menit. Supernatan yang didapatkan kemudian diambil sebanyak 500 µL dan direaksikan dengan 500 µL reagen DNS. Campuran ini selanjutnya dipanaskan selama 5-15 menit pada suhu >90°C. Setelah selesai dipanaskan, campuran ditambahkan 167 µL larutan K-Na-tartart 40% lalu didinginkan hingga mencapai suhu ruang. Konsentrasi glukosa yang tersisa diukur absorbansinya pada λ 575 nm.

2.7. Uji Pengaruh Penambahan PAH Terhadap Nilai Kapasitansi Wafer Enzim GOD Terimobilisasi pada Ca-Bentonit Termodifikasi|PAH (LCR Meter)

Sebanyak 100 μL larutan enzim GOD terimobilisasi pada Ca-bentonit termodifikasi asam|PAH (rasio 1:0, 1:1, 1:2, dan 1:3) dimasukkan ke dalam *chamber* alat yang telah dihubungkan dengan alat LCR meter dengan range 20 μF . Dilakukan pencatatan nilai kapasitansi awal dan pada saat dilakukan penambahan 100 μL substrat glukosa 1000 ppm, nilai kapasitansi yang terbaca oleh LCR meter dicatat kembali. Selisih kapasitansi merupakan hasil reaksi enzimatis.

2.8 Penyiapan Lapisan Wafer Enzim GOD Terimobilisasi pada Ca-Bentonit Termodifikasi|PAH untuk Analisa FTIR

Rasio konsentrasi antara GOD terimobilisasi pada Ca-bentonit termodifikasi asam dan PAH yang digunakan untuk analisa FTIR adalah 1:1, 1:2, dan 1:3. Untuk pembuatan lapisan dengan rasio 1:1, maka sebanyak 2 mL larutan GOD terimobilisasi pada Ca-bentonit termodifikasi asam ditambahkan dengan 2 mL larutan PAH konsentrasi 5 mg/mL (pelarut PAH yang digunakan adalah aquabides). Untuk pembuatan lapisan dengan rasio 1:2, maka sebanyak 2 mL larutan GOD terimobilisasi pada Ca-bentonit termodifikasi asam ditambahkan dengan 4 mL larutan PAH konsentrasi 5 mg/mL dan demikian seterusnya untuk variasi yang lain. Campuran kemudian dihomogenkan dan dibiarkan selama 2 jam pada suhu ruang. Setelah itu campuran disentrifuge dengan kecepatan 4000 rpm selama 30 menit pada suhu 4°C. Supernatan yang terbentuk kemudian dibuang, sedangkan pellet yang didapatkan dikering anginkan pada suhu ruang untuk selanjutnya dilakukan analisa FTIR.

3. Rancangan Alat

3.1. Uji Coba Alat dengan Beberapa Senyawa yang Terlibat dalam Reaksi Enzimatis

Beberapa sampel yang diukur nilai kapasitansinya antara lain: aquadest, substrat glukosa (10 ppm, 100 ppm, dan 1000 ppm), asam glukonat, H_2O_2 , dan buffer fosfat 0,1 M pH 7. Sebanyak 200 μL sampel tersebut dimasukkan ke dalam *chamber* alat yang telah dihubungkan ke alat LCR meter pada range 20 μF . Nilai kapasitansi yang ditunjukkan oleh LCR meter kemudian dicatat.

3.2. Pengujian Kerja Alat dengan Variasi Konsentrasi Glukosa

Untuk tahapan pengujian kerja alat dilakukan pengukuran yang melibatkan reaksi antara enzim GOD bebas, enzim GOD terimobilisasi, dan juga kontrol. Pada tahapan verifikasi ini variasi konsentrasi glukosa yang digunakan yaitu 10 ppm, 100 ppm, dan 1000 ppm. Sebanyak 100 μL sampel dimasukkan ke dalam *chamber* alat yang telah terhubung pada LCR meter dengan range 20 μF . Nilai kapasitansi awal yang ditunjukkan LCR meter dicatat, kemudian sebanyak 100 μL substrat glukosa dimasukkan ke dalam *chamber* alat dan dicatat kembali nilai kapasitansinya.

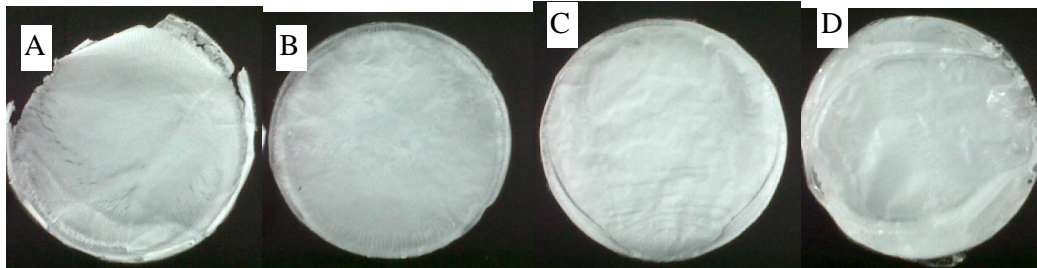
3.3. Uji Aktivitas Enzim (Inkubasi 1 Menit) Sebagai Data Pembanding Kerja Alat

Sebagai pembanding dari pembacaan nilai kapasitansi, maka dilakukan pengukuran terhadap aktivitas enzim menggunakan metode DNS, dimana reaksi antara enzim dengan substrat dilakukan sesuai dengan reaksi yang terjadi pada alat LCR meter. Jadi, sebanyak 500 μL enzim (enzim GOD bebas dan GOD terimobilisasi) direaksikan dengan 500 μL substrat glukosa (1000 ppm) selama 1 menit pada suhu ruang. Untuk menghentikan reaksi, ke dalam campuran ditambahkan 1 mL reagen DNS. Campuran kemudian diambil dan disentrifuge dengan kecepatan 13000 rpm, suhu 4°C selama 7 menit. Sebanyak 1 mL supernatan yang terbentuk diambil dan dipanaskan selama 5-15 menit pada suhu >90°C. Setelah proses pemanasan selesai, larutan ditambahkan 167 μL larutan K-Na-tartart 40% lalu didinginkan hingga mencapai suhu ruang. Konsentrasi glukosa yang tersisa diukur absorbansinya pada λ 575 nm.

F. HASIL DAN PEMBAHASAN

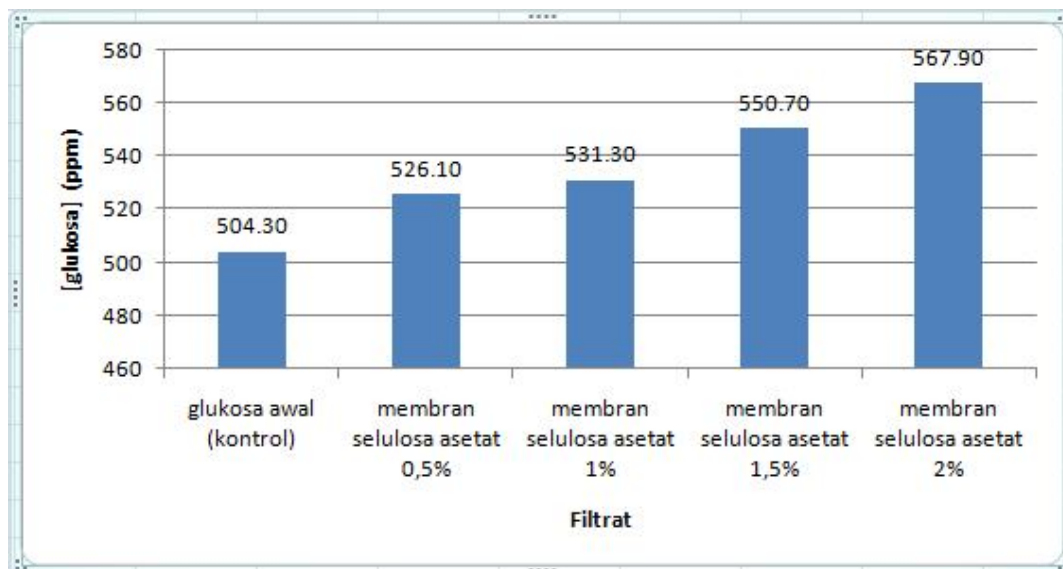
F.1. Pembuatan membran selulosa asetat

Fungsi membran selulosa asetat pada wafer enzim yang dibuat bertujuan untuk menyaring substrat kompleks berupa sampel darah manusia. Diharapkan hanya substrat glukosa yang melewati membran dan kemudian bereaksi dengan enzim GOD terimobilisasi. Membran selulosa asetat pada penelitian ini dibuat dengan berbagai variasi konsentrasi, yakni 0,5%, 1%, 1,5%, dan 2%. Pembuatan membran selulosa asetat dengan berbagai variasi konsentrasi ini ditujukan untuk melihat kemampuan substrat melewati membran, penampakan mikroskopis dan makroskopis dari membran yang dihasilkan. Hasil dari pembuatan membran selulosa asetat dengan berbagai variasi konsentrasi dapat dilihat pada Gambar 3.



Gambar 3. Penampakan makroskopis membran selulosa asetat (a) 0,5% (b) 1% (c) 1,5% (d) 2%.

Dari masing-masing membran selulosa asetat yang dihasilkan, kemudian dilakukan uji kemampuan substrat glukosa melewati membran. Berikut adalah hasil pengukuran konsentrasi glukosa filtrat yang diuji dengan metode DNS (Gambar 4).

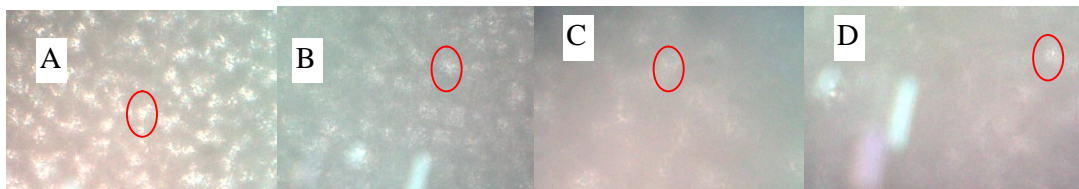


Gambar 4. Hasil pengukuran konsentrasi filtrat glukosa dari masing-masing membran selulosa asetat.

Pada saat dilakukan pengukuran kemampuan substrat glukosa melewati membran, terdapat perbedaan antara konsentrasi glukosa awal dengan konsentrasi glukosa yang terdapat pada filtrat, dimana konsentrasi glukosa pada filtrat lebih besar dibandingkan konsentrasi glukosa awal (Gambar 4). Konsentrasi glukosa pada filtrat lebih besar dibandingkan konsentrasi glukosa awal, hal ini mungkin disebabkan oleh terjadinya penguapan pada pelarut glukosa (aquadest) akibat proses penyaringan yang lama (proses penyaringan dilakukan selama semalam). Akibat penguapan tersebut, konsentrasi glukosa dalam larutan filtrat menjadi lebih besar dibandingkan konsentrasi glukosa awalnya. Pada saat dilakukan uji kemampuan substrat melewati membran, membran selulosa asetat dengan konsentrasi rendah memiliki daya serap yang lebih tinggi dibandingkan membran selulosa asetat dengan konsentrasi tinggi. Hal ini

mungkin disebabkan celah/pori-pori membran selulosa asetat pada konsentrasi rendah lebih banyak sehingga larutan lebih mudah untuk melewati membran, sebaliknya pada membran selulosa asetat dengan konsentrasi lebih tinggi jumlah celah/pori-pori membran lebih sedikit atau lebih rapat sehingga larutan sulit untuk menembus membran.

Pada penelitian ini juga dilakukan pengamatan mikroskopis terhadap pori-pori membran selulosa asetat yang dibuat. Pengamatan dilakukan dengan memilih bagian membran yang terlihat homogen/merata. Perbesaran yang digunakan adalah 1000x (gambar 5).



Gambar 5. Penampakan pori-pori membran selulosa asetat secara mikroskopis perbesaran 1000x. (a) 0,5% (b) Membran 1% (c) 1,5% (d) 2%. (lingkaran merah adalah pori membran)

Pada membran selulosa asetat konsentrasi rendah, jumlah pori yang terlihat dengan perbesaran mikroskop 1000x lebih banyak dan jumlahnya terus berkurang dengan bertambahnya konsentrasi membran. Hal ini dapat terjadi kemungkinan disebabkan pada konsentrasi membran yang semakin tinggi akan mengakibatkan kerapatan antarserat selulosa asetat juga semakin tinggi sehingga pori-pori membran akan semakin mengecil. Pada percobaan ini tidak dapat diketahui ukuran pori-pori dari masing-masing membran.

Dengan mempertimbangkan hasil membran selulosa asetat berbagai variasi konsentrasi yang telah dibuat, baik melalui penampakan makroskopis, penampakan mikroskopis dan permeabilitas membran terhadap substrat maka membran selulosa asetat pada penelitian ini tidak dimasukkan dalam komposisi lapisan wafer enzim yang akan dibuat. Membran selulosa asetat yang telah dibuat tidak dapat memenuhi prinsip kerja biosensor yaitu pengukuran sampel yang cepat. Sehingga dalam penelitian selanjutnya akan dibuat sebuah wafer enzim yang terdiri dari enzim glukosa oksidase (GOD) terimobilisasi pada Ca-bentonit termodifikasi surfaktan serta polimer *Poly-Allylamine Hydrochloride* (PAH).

F.2. Pembuatan Lapisan Wafer Enzim GOD Terimobilisasi pada Ca-Bentonit Termodifikasi Asam/TMAOH|PAH

F.2.1. Imobilisasi GOD pada Ca-Bentonit Termodifikasi Asam dan surfaktan

Imobilisasi GOD pada Ca-Bentonit Termodifikasi Asam

Modifikasi Ca-bentonit dengan asam akan menyebabkan Ca-bentonit menjadi lebih aktif. Secara alami bentonit memiliki sifat daya adsorpsi yang cukup tinggi. Aktivasi bentonit dengan asam (dalam penelitian ini digunakan asam HCl) akan menyebabkan terjadinya pertukaran kation Ca^{2+} yang terletak pada daerah interlayer dengan ion H^{+} yang berasal dari asam yang digunakan.

Menurut Supeno (2009), aktivasi bentonit dengan kontak asam selain akan menyebabkan pertukaran kation Ca^{+} dengan ion H^{+} , juga akan menyebabkan lepasnya ion Al, Fe, dan Mg serta pengotor lainnya pada kisi-kisi struktur bentonit, sehingga secara fisik bentonit menjadi lebih aktif. Selama proses *bleaching* tersebut Al, Fe, dan Mg akan larut dalam larutan, kemudian terjadi penyerapan asam ke dalam struktur bentonit sehingga rangkaian struktur (*framework*) mempunyai area yang lebih luas. Hal yang sama juga diungkapkan oleh Motlagh *et al.* (2011), yang menyatakan aktivasi bentonit dengan asam dapat menyebabkan perubahan pada lembaran oktahedral bentonit sehingga menyebabkan pelarutan beberapa kation bentonit (Mg^{2+} , Fe^{2+} , Al^{3+}) dan juga dekomposisi struktur montmorillonit. Sedangkan menurut Adams, 1987; Rhodes dan Brown 1992, 1993, treatment bentonit dengan asam dapat

menyebabkan peningkatan luas permukaan, porositas dan *Brønsted acidity* dari lempung (Gates *et al.*, 2000). Imobilisasi yang terjadi antara enzim GOD dengan Ca-bentonit termodifikasi asam adalah metode adsorpsi dengan *ionic binding*. Alasannya adalah karena adanya perbedaan muatan pada bagian interlayer Ca-bentonit. Setelah proses modifikasi menggunakan asam, ion H⁺ dari asam HCl akan masuk ke dalam bagian interlayer dan menggantikan ion Ca²⁺. Sedangkan enzim GOD yang dilarutkan dalam buffer fosfat 0,1 M pH 7 akan bermuatan negatif.

Imobilisasi GOD pada Ca-Bentonit Termodifikasi Asam dan surfaktan

Pada proses interkalasi Ca-bentonit menggunakan TMAOH yang terjadi adalah pertukaran kation antara keduanya. Ca-bentonit banyak mengandung kation anorganik Ca²⁺ dan Mg²⁺, dan ketika terjadi interkalasi dengan surfaktan TMAOH maka kation organik amonium akan masuk di lapisan interlayer sehingga terjadi pertukaran kation dengan Ca²⁺ dan Mg²⁺. Proses pertukaran kation ini menyebabkan jarak antar layer pada molekul Ca-bentonit bertambah besar (Syuhada *et al.*, 2009).

Bentonit yang termodifikasi surfaktan akan memiliki afinitas yang lebih besar terhadap senyawa organik (Wardhana, 2012). Gugus hidrofilik surfaktan akan berikatan dengan bentonit sedangkan gugus hidrofobiknya akan memberikan sifat hidrofobik pada permukaan bentonit. Pada penelitian ini, proses imobilisasi enzim GOD pada material Ca-bentonit menggunakan prinsip imobilisasi reversibel yaitu adsorpsi fisik non-spesifik. Enzim GOD terimobilisasi pada permukaan pori Ca-bentonit akibat adanya gaya intermolekular non-spesifik (ikatan hidrogen) yang terjadi antara Ca-bentonit (adsorben) dengan enzim GOD (adsorbat) (Maron *et al.*, 1974).

Untuk mengetahui persentase jumlah enzim yang terimobilisasi pada bentonit termodifikasi asam HCL 2M dan TMAOH5% maka dilakukan pengukuran konsentrasi awal enzim GOD yang akan diimobilisasi dan setelah proses imobilisasi selesai, dilakukan kembali pengukuran konsentrasi enzim GOD pada supernatan. Pengukuran konsentrasi enzim GOD dilakukan dengan menggunakan metode Hartree Lowry. Konsentrasi enzim GOD yang terimobilisasi adalah selisih antara konsentrasi awal dengan konsentrasi enzim GOD yang tidak terimobilisasi (GOD yang tersisa pada supernatan dan hasil cucian).

Tabel 1. Hasil imobilisasi bentonit termodifikasi asam dan surfaktan

Modifikasi	Konsentrasi enzim		Terimobilisasi/awal (%)
	Awal (IU/ml)	Terimobilisasi (IU/ml)	
Asam 2M (24 jam)	58,83	25,33	43,06
Asam 2M (48 jam)	60,06	49,56	82,52
TMAOH 5% (48 jam)	57,95	36,92	63,71

F.2.2. Uji aktifitas enzim GOD bebas dan terimobil menggunakan metode DNS

Setelah proses imobilisasi enzim GOD pada Ca-bentonit termodifikasi asam berhasil dilakukan, selanjutnya dilakukan pengukuran aktivitas enzim GOD terimobilisasi guna mengetahui penurunan aktivitasnya jika dibandingkan dengan enzim GOD bebas. Aktivitas enzim GOD pada penelitian ini didasarkan pada jumlah glukosa yang dikatalisis (ppm) selama inkubasi pada kondisi percobaan. Konsentrasi glukosa yang dikonversi diketahui dari absorbansi hasil reaksi pada panjang gelombang 575 nm. Aktivitas enzim GOD dapat dihitung dengan rumus:

Aktivitas GOD (ppm/menit) = $\frac{\text{glukosa dikatalisis}}{\text{waktu inkubasi}}$

Pengukuran aktivitas enzim GOD dilakukan dengan menggunakan metode DNS dengan 3 kali replikasi. Berikut adalah hasil perhitungan aktivitas enzim GOD bebas dan aktivitas enzim GOD terimobilisasi.

Tabel 2. Uji aktivitas enzim GOD bebas dan enzim GOD terimobilisasi

Replikasi \ Jenis modifikasi	Aktifitas enzim (ppm/menit)			
	Modifikasi asam		Modifikasi TMAOH	
	i	b	i	b
1	6,49	11,82	8,16	11,82
2	7,49	12,76	7,76	12,76
3	6,36	14,02	8,89	14,02
Rata-rata	6,78 ± 0,62	12,87 ± 1,1	8,27 ± 0,57	12,87 ± 1,1

Ket: i = GOD terimobil; b = GOD bebas

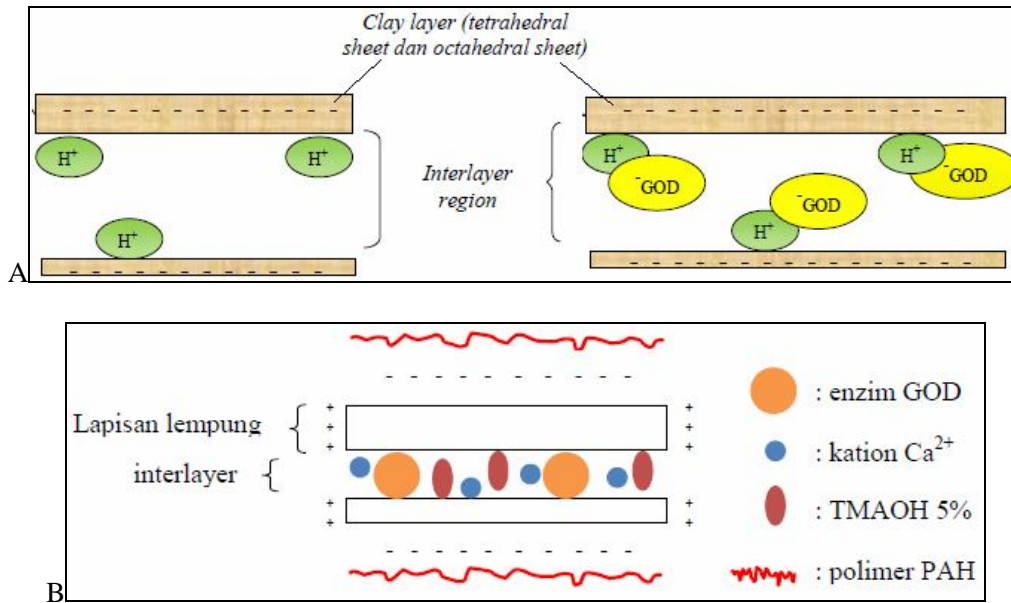
Pengukuran aktivitas enzim GOD dilakukan dengan menggunakan metode DNS dengan 3 kali replikasi.

Dari tabel 2 dapat dilihat bahwa proses imobilisasi ternyata benar menyebabkan penurunan aktivitas enzim, yaitu sebesar 47,32% (untuk modifikasi dengan asam) dan 35,75% (untuk modifikasi dengan surfaktan).

Penurunan aktivitas pada enzim GOD terimobilisasi ini kemungkinan besar disebabkan oleh pengaruh matriks imobilisasi, yakni Ca-bentonit itu sendiri (Akibat halangan sterik yang besar). GOD yang terjebak di dalam bagian interlayer Ca-bentonit melalui adsorpsi dan/atau terikat melalui *ionic binding* dengan ion H⁺ mengakibatkan kontak enzim dengan substrat menjadi terhalang. Pada enzim GOD bebas, enzim yang berada di dalam larutan akan langsung dapat mengkatalisis substrat glukosa yang ada dalam larutan, sedangkan untuk enzim GOD terimobilisasi karena letaknya yang terjebak di dalam bagian interlayer akan memerlukan waktu yang lebih lama untuk dapat bertemu dengan substrat glukosa.

Alasan lain yang mungkin dapat menjadi penyebab terjadinya penurunan aktivitas enzim setelah proses imobilisasi adalah terjadinya sedikit perubahan pada struktur enzim GOD terimobilisasi. Jika sisi aktif enzim mengalami perubahan akibat berikatan dengan Ca-bentonit maka pengikatan terhadap substrat glukosa menjadi tidak optimal.

Selanjutnya dibuat sebuah wafer enzim yang terdiri dari enzim GOD terimobil pada Ca-bentonit dan polimer PAH. Polimer yang digunakan dalam penelitian ini adalah jenis polielektrolit bermuatan positif (polikation) yaitu PAH (*Poly-allyamine hydrochloride*). PAH banyak mengandung gugus amina sepanjang rantai polimernya (Ramdhani, 2008). Agar terbentuk suatu lapisan wafer enzim artinya harus terjadi interaksi antara enzim GOD terimobil pada Ca-bentonit termodifikasi asam HCl atau surfaktan TMAOH 5% dengan polimer, maka dipilih polimer PAH yang termasuk polikation. Pada larutan yang memiliki pH netral atau asam, partikel bentonit memiliki muatan negatif pada *basal surface* dan muatan positif pada *edge surface*. Muatan negatif pada *basal surface* ini tidak terpengaruh oleh pH (pH *independent*) sedangkan muatan positif pada *edge surface* tergantung pada pH (pH *dependent*). Pada pH diatas titik isoelektriknya, yaitu diatas pH 7 maka *edge surface* bentonit akan bermuatan negatif (Oztekin *et al.*, 2002). Karena pada penelitian ini digunakan buffer fosfat 0,1 M pH 7 maka tidak akan terjadi interaksi antara polimer PAH dengan *edge surface*. Dengan demikian interaksi akan terjadi antara *basal surface* Ca-bentonit yang cenderung bermuatan negatif dengan polimer PAH yang bermuatan positif. Gambaran penempelan polimer PAH pada Ca-bentonit termodifikasi surfaktan adalah sebagai berikut:



Gambar 6. Penempelan polimer PAH pada Ca-bentonit (A) termodifikasi asam HCl 2M, dan (B) termodifikasi surfaktan TMAOH 5%

F.2.3. Hasil Uji Pengaruh Penambahan PAH Terhadap Aktivitas Wafer Enzim GOD Terimobilisasi pada Ca-Bentonit Termodifikasi Asam/TMAOH|PAH (Metode DNS)

Kestabilan dan kinerja wafer enzim dapat ditingkatkan dengan penambahan sebuah *conducting polymer* (Nevin *et al.*, 2002). Untuk mengetahui pengaruh penambahan polimer terhadap aktivitas wafer enzim, maka wafer enzim yang telah ditambahkan dengan polimer PAH (Ca-bentonit: PAH = 1:1, 1:2, 1:3) akan dibandingkan dengan kontrol yaitu wafer enzim tanpa penambahan polimer PAH (1:0). Pengaruh penambahan polimer PAH terhadap aktivitas masing-masing wafer enzim diketahui dari absorbansi yang terbaca pada λ 575 nm metode spektrofotometri DNS. Wafer enzim direaksikan dengan substrat glukosa 1000 ppm dan diinkubasi pada suhu 40°C selama 30 menit. Nilai aktivitas masing-masing wafer enzim dapat diukur dengan mengetahui konsentrasi awal substrat glukosa 1000 ppm dan konsentrasi glukosa yang tersisa hasil reaksi. Pada tabel 3 dapat dilihat nilai aktivitas (ppm/min) masing-masing wafer enzim.

Tabel 3. Pengaruh penambahan PAH terhadap pengukuran aktivitas enzim GOD terimobilisasi pada Ca-bentonit termodifikasi asam/TMAOH 5% (Metode DNS)

Replikasi \ Wafer	Aktifitas wafer enzim (ppm/menit)							
	GOD terimobilisasi:PAH							
	1:0		1:1		1:2		1:3	
	As*	Sur*	As*	Sur*	As*	Sur*	As*	Sur*
1	5,96	7,16	4,02	6,16	5,42	5,62	5,29	3,89
2	7,16	7,02	5,89	7,02	5,56	6,02	6,09	6,69
3	6,89	6,29	5,16	6,09	3,82	5,42	6,69	5,76
Rata-rata	6,67 ± 0,63	6,82 ± 0,47	5,02 ± 0,94	6,42 ± 0,52	4,93 ± 0,96	5,69 ± 0,31	6,02 ± 0,70	5,44 ± 1,43

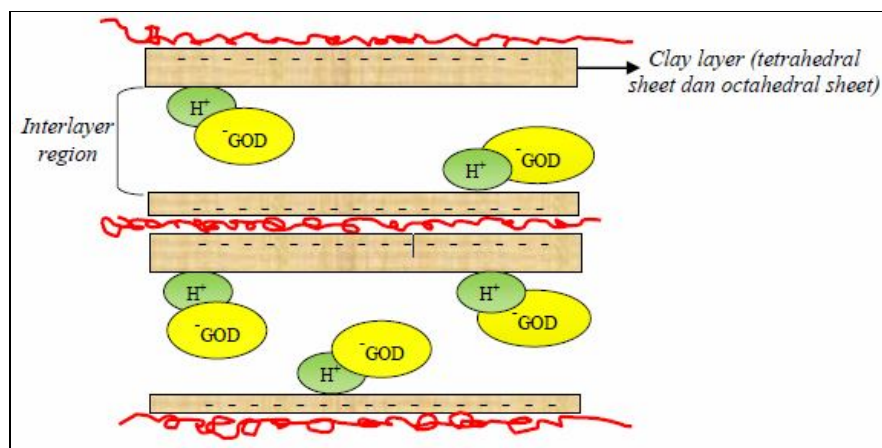
* Keterangan: As = GOD terimobilisasi pada Ca-bentonit termodifikasi asam HCl 2M; Sur = GOD terimobilisasi pada Ca-bentonit termodifikasi surfaktan TMAOH

Dari tabel 3 dapat dilihat bahwa penambahan polimer PAH pada wafer enzim mempengaruhi nilai aktivitas wafer enzim. Jika dibandingkan antara wafer enzim variasi rasio konsentrasi Ca-bentonit:PAH = 1:1, 1:2 dan 1:3 maka terdapat pola penurunan aktivitas. Semakin tinggi rasio konsentrasi PAH dalam wafer enzim maka semakin menurun nilai aktivitasnya. Penambahan polimer PAH akan menaikkan halangan sterik sehingga substrat sulit masuk ke dalam pori Ca-bentonit sehingga interaksi antara substrat glukosa dengan enzim GOD terimobil berkurang dan menurunkan aktivitasnya. Hal ini juga dibuktikan dengan membandingkan aktivitasnya dengan aktivitas wafer enzim tanpa penambahan polimer (kontrol), dimana aktivitas wafer enzim tanpa penambahan polimer lebih tinggi dibandingkan ketiganya.

Namun ketika perbedaan nilai aktivitas wafer enzim dengan berbagai variasi rasio konsentrasi tersebut diuji dengan *Tukey method*, didapat nilai *p-value* sebesar 0,213 dengan $\alpha = 0,05$. Nilai *p-value* yang lebih besar dari α menunjukkan bahwa tidak ada perbedaan signifikan antara aktivitas wafer enzim tanpa penambahan polimer (1:0) dan dengan penambahan polimer (1:1, 1:2, 1:3) (Lampiran 7). Dapat dikatakan bahwa penambahan polimer ternyata tidak memberikan pengaruh terhadap nilai aktivitas wafer enzim yang terukur dengan metode DNS. Aplikasi dari penambahan PAH adalah untuk membuat *redox hydrogel-modified electrodes* untuk pengukuran respon suatu enzim (Sigma-Aldrich), jadi penambahan PAH ini lebih cocok jika digunakan dalam pengukuran secara elektrokimia (reaksi redoks).

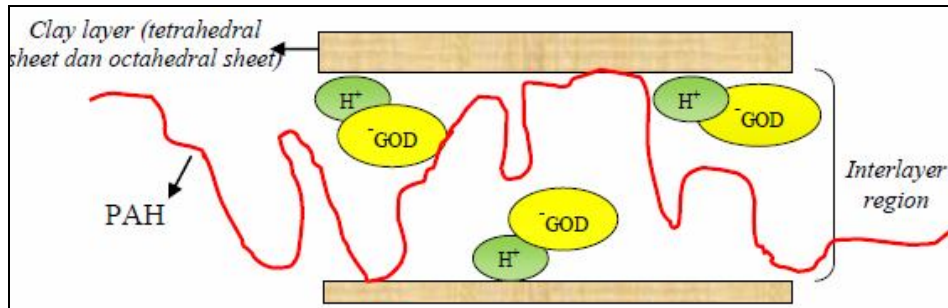
Menurut Öztekin *et al.* (2001), dalam larutan netral maupun asam, partikel montmorillonit memiliki muatan negatif pada permukaan (*faces*) dan bermuatan positif pada bagian tepi (*edges*). Muatan negatif pada permukaan tidak bergantung pada pH, sedangkan muatan pada bagian tepi bergantung terhadap pH. Sedangkan Polialilamin hidroklorida (*Polyallylamine hydrochloride/PAH*) menurut Antipov *et al.* (2003) adalah suatu polielektrolit kationik yang dibuat dari polimerisasi *allylamine*. Pada proses pembuatan wafer enzim GOD terimobilisasi pada Ca-bentonit termodifikasi asam/PAH terdapat beberapa kemungkinan interaksi yang terjadi. Kemungkinan-kemungkinan tersebut antara lain dapat digambarkan sebagai berikut:

- a. Polimer PAH karena bermuatan positif menempel pada permukaan Ca-bentonit yang bermuatan negatif. Fenomena ini ditunjukkan dengan struktur Ca-bentonit yang terlihat lebih lengket.



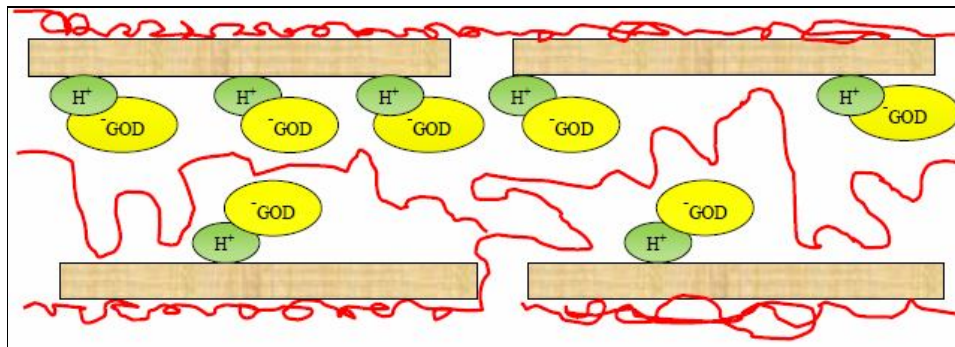
Gambar 7. Penempelan polimer PAH pada permukaan bentonit

- b. Polimer PAH menyusup/masuk ke dalam celah interlayer dari Ca-bentonit sehingga terjadi pelebaran pada bagian *interlayer region* Ca-bentonit. Fenomena ini ditunjukkan dengan struktur Ca-bentonit yang terlihat secara kasat mata lebih mengembang



Gambar 8. Proses penyisipan polimer PAH pada bagian interlayer Ca-bentonit.

- c. Polimer PAH menempel pada permukaan Ca-bentonit (*clay layer*) dan juga menyusup/masuk ke dalam celah interlayer dari Ca-bentonit sehingga molekul antar Ca-bentonit saling terhubung dan terjadi pelebaran pada *interlayer region* Ca-bentonit. Fenomena ini ditunjukkan dengan struktur Ca-bentonit yang terlihat secara kasat mata lebih lengket/menggumpal dan mengembang.



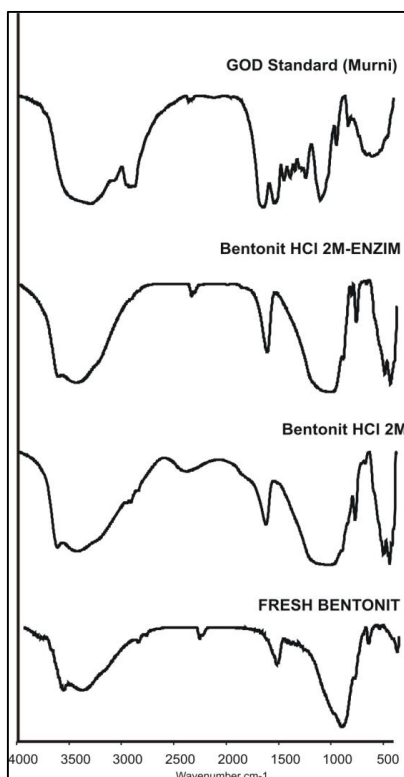
Gambar 9. Proses penempelan dan penyisipan polimer PAH pada Ca-bentonit..

F.2.4. Uji Pengaruh Penambahan Polimer PAH Terhadap Nilai Kapasitansi Wafer Enzim (GOD Terimobilisasi Pada Ca-bentonit Termodifikasi Asam/Surfaktan/PAH) Dengan LCR Meter

Wafer enzim dengan berbagai variasi rasio konsentrasi Ca-bentonit:PAH diuji nilai kapasitansinya dengan alat LCR meter. Reaksi antara wafer enzim dengan substrat glukosa 1000 ppm berlangsung selama 1 menit di dalam *chamber* yang terhubung LCR meter. Pencatatan nilai kapasitansi dilakukan pada saat awal penambahan wafer enzim ke dalam *chamber* dan setelah penambahan substrat glukosa sehingga didapatkan nilai selisih kapasitansi. Selisih nilai kapasitansi yang terbaca pada alat merupakan hasil pembacaan elektron yang dihasilkan dari reaksi enzimatik wafer enzim dengan substrat glukosa 1000 ppm. Tabel 4 menunjukkan nilai selisih kapasitansi yang terbaca oleh alat LCR meter pada *range* pembacaan 20 μF .

F.2.5. Karakterisasi wafer menggunakan FTIR

Gambar 10 menunjukkan Spektrogram FTIR untuk fresh bentonit, bentonit termodifikasi asam (2M) dan GOD terimobilisasi pada bentonit-asam (2M). Pada karakterisasi bentonit alam dengan perlakuan HCl 2M menunjukkan adanya perubahan struktur pori-pori, hal ini ditunjukkan adanya perubahan puncak serapan pada daerah finger print yaitu antara $400 - 550 \text{ cm}^{-1}$; serapan pada daerah kisaran 800 cm^{-1} dan 900 cm^{-1} ; dan perubahan bentuk puncak utama pada daerah $100 - 1100 \text{ cm}^{-1}$. Serapan lain yang memperkuat semakin banyaknya ikatan O-Si-O adalah adanya interaksi ikatan tersebut dengan ion H^+ yang membentuk puncak serapan khas gugus OH pada daerah serapan $3400-3750 \text{ cm}^{-1}$. Gambar 11 menunjukkan Spektrogram FTIR untuk GOD terimobilisasi pada bentonit-asam (2M) dengan penambahan PAH.



Gambar 10 : Spektrogram FTIR bentonit alam dengan perlakuan HCl 2M dan immobilisasi enzim GOD dalam bentonit-HCl 2M.

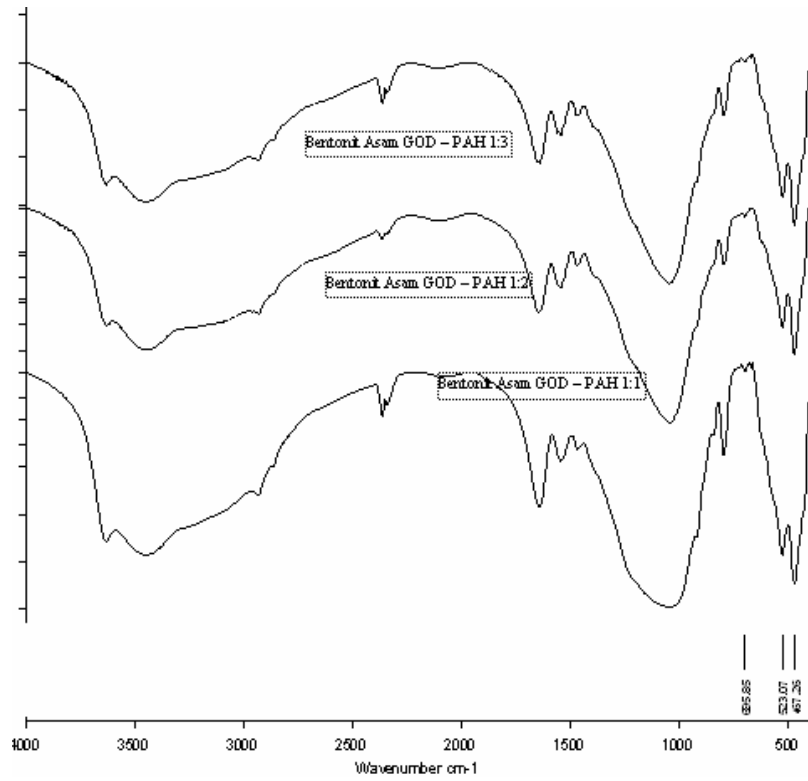
Puncak serapan pada $400 - 550 \text{ cm}^{-1}$ menunjukkan adanya bentuk *double ring* struktur tetrahedral SiO_4 yang artinya menunjukkan adanya struktur pori-pori dalam bentonit semakin terbuka/ukurannya semakin besar. Hal ini diperkuat dengan semakin tajamnya puncak serapan pada kisaran 800 cm^{-1} dan 900 cm^{-1} , yang merupakan serapan vibrasi rentangan asimetri dari ikatan O-Si-O-Si-O struktur ikatan antar tetrahedral SiO_4 .

Interaksi antara ion H^+ dan gugus Si-O bentonit ditunjukkan dengan adanya puncak serapan pada kisaran bilangan gelombang $3400 - 3600 \text{ cm}^{-1}$ yang tampak sedikit melebar. Hal ini diperkuat dengan puncak pada 1650 cm^{-1} yang semakin lebar dan intensitasnya semakin tinggi dibandingkan dengan bentonit alam. Serapan ini merupakan serapan vibrasi rentangan simetri ikatan O-H yang disebabkan oleh adanya ikatan hydrogen Si-O --- H^+ dari asam HCl dan enzim GOD.

Interaksi antara enzim GOD dengan bentonit alam HCl 2M ditunjukkan dengan munculnya puncak serapan pada $790 - 840 \text{ cm}^{-1}$ yang tajam, hal ini menunjukkan adanya vibrasi *stretching* asimetri ikatan Si-O-GOD. Ikatan yang terjadi dimungkinkan adanya ikatan hydrogen yang kuat

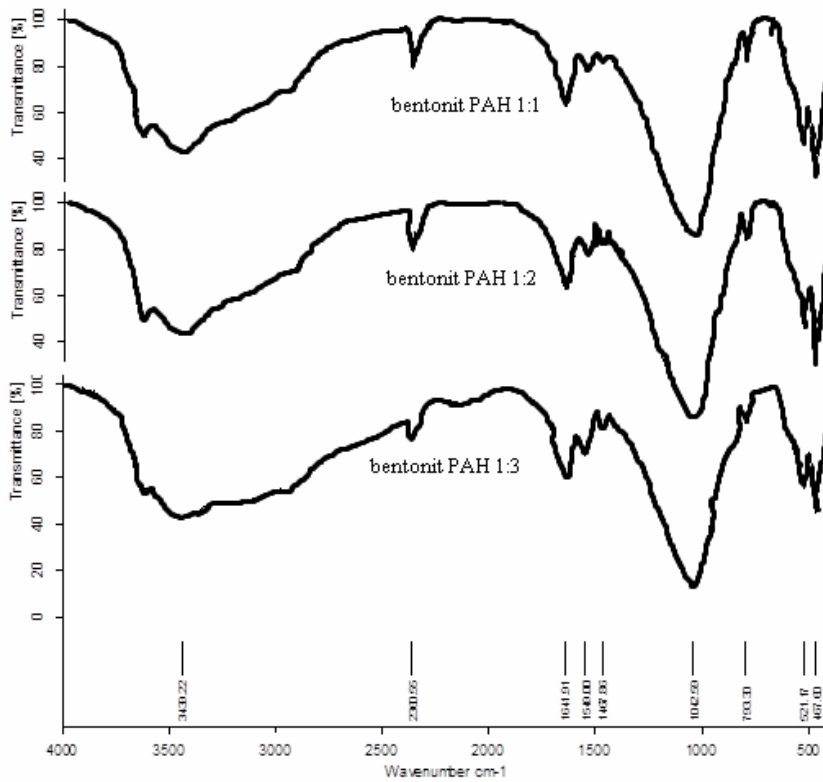
antara gugus SiO_4 ujung dengan atom H dari gugus glukosa.

Pengaruh penambahan PAH terhadap GOD terimobilisasi pada bentonit-asam (2M) dapat dilihat pada gambar 11. Interaksi antara PAH dengan GOD dan bentonit-asam ditunjukkan dengan munculnya serapan pada rentang 1460 cm^{-1} dan 1540 cm^{-1} yang lemah. Serapan pada rentang 1460 cm^{-1} merupakan serapan khas yang ditimbulkan oleh adanya atom N (dalam hal ini atom N dari gugus NH_2 PAH) yang berinteraksi secara elektrostatis dengan O pada pusat asam Lewis bentonit. Hal ini diperkuat dengan munculnya serapan pada 1540 cm^{-1} yang ditimbulkan oleh vibrasi *stretching* asimetri ikatan O---N (dalam hal ini O berasal dari pusat asam Lewis bentonit Si-O). Hal ini juga diperkuat dengan semakin berkurangnya intensitas serapan pada $790 - 840 \text{ cm}^{-1}$ yang disebabkan oleh vibrasi *stretching* asimetri ikatan Si-O-GOD melalui ikatan hydrogen antara gugus SiO_4 ujung dengan atom H dari gugus glukosa. Berkurangnya intensitas tersebut dapat terjadi karena adanya interaksi O---N sehingga mengurangi interaksi Si-O-GOD. Dengan semakin meningkatnya konsentrasi PAH yang ditambahkan ke dalam GOD terimobilisasi pada bentonit-asam (2M), terlihat bahwa intensitas serapan pada 1460 cm^{-1} dan 1540 cm^{-1} semakin kuat, sedangkan intensitas serapan pada $790 - 840 \text{ cm}^{-1}$ semakin berkurang. Hal tersebut memperkuat penjelasan sebelumnya.



Gambar 11. Spektrogram FTIR GOD terimobilisasi pada bentonit-asam (2M) dengan penambahan PAH

Gambar 12 menunjukkan spektrogram FTIR GOD terimobilisasi pada bentonit-TMAOH (5%) dengan penambahan PAH.

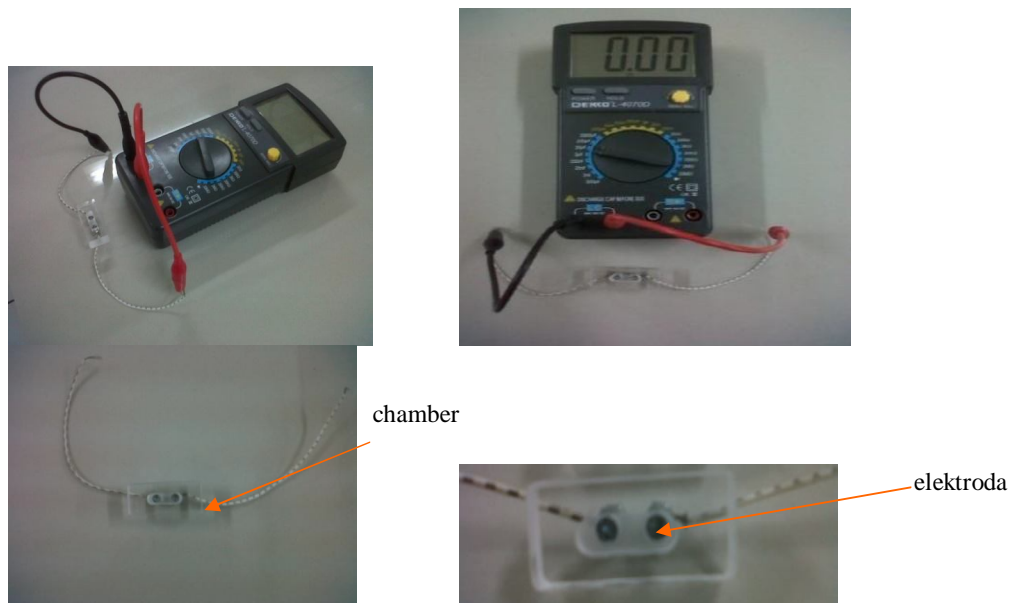


Gambar 12. Spektrogram FTIR GOD terimobilisasi pada bentonit-TMAOH (5%) dengan penambahan PAH

Interaksi antara PAH dengan enzim GOD dan Ca-bentonit termodifikasi surfaktan TMAOH 5% ditunjukkan dengan munculnya serapan pada rentang 1460 cm^{-1} hingga 1540 cm^{-1} yang lemah. Serapan pada rentang 1460 cm^{-1} merupakan serapan khas yang ditimbulkan oleh adanya atom N. Atom N yang terbaca berasal dari gugus NH_2 polimer PAH. Dalam hal ini atom N berinteraksi secara elektrostatis dengan atom O pada pusat asam Lewis Ca-bentonit. Hal tersebut diperkuat dengan munculnya serapan pada 1540 cm^{-1} yang ditimbulkan oleh vibrasi *stretching* asimetri ikatan O---N (dalam hal ini atom O berasal dari pusat asam Lewis Ca-bentonit Si-O). Adanya vibrasi *stretching* asimetri ikatan O---N juga dibuktikan dengan berkurangnya intensitas serapan pada rentang 790 cm^{-1} hingga 840 cm^{-1} . Vibrasi *stretching* asimetri ikatan Si-O-GOD terjadi melalui ikatan hidrogen antara gugus SiO_4 ujung dengan atom H dari gugus enzim GOD terlihat pada rentang 790 cm^{-1} hingga 840 cm^{-1} . Berkurangnya intensitas tersebut dapat terjadi karena adanya interaksi O---N sehingga mengurangi interaksi Si-O-GOD. Sehingga dapat dikatakan bahwa semakin meningkatnya konsentrasi PAH yang ditambahkan ke dalam enzim GOD terimobilisasi pada Ca-bentonit termodifikasi surfaktan TMAOH 5% maka intensitas serapan pada 1460 cm^{-1} dan 1540 cm^{-1} akan semakin kuat, sedangkan intensitas serapan pada 790 cm^{-1} hingga 840 cm^{-1} semakin berkurang.

F.2.6. Uji coba rancangan alat

Untuk mengetahui pengaruh penambahan PAH dengan berbagai perbandingan rasio konsentrasi dibuat suatu rancangan alat yang dihubungkan ke LCR meter. Alat yang terhubung dengan LCR meter akan mengukur besar kapasitansi dari sampel yang diuji. Range/sensitivitas yang digunakan selama percobaan adalah $20\ \mu\text{F}$. Berikut adalah gambaran dari alat LCR meter dan *chamber* alat (rancangan alat yang dibuat) (Gambar 13).



Gambar 13. Rangkaian alat uji berdasarkan LCR meter

Nilai kapasitansi yang terbaca oleh alat diduga adalah pengaruh elektron yang dihasilkan dari reaksi enzimatik antara wafer enzim dan substrat glukosa. Untuk mengetahui keakuratan pembacaan alat LCR meter maka dilakukan pembacaan nilai kapasitansi berbagai sampel. Sampel yang akan diukur nilai kapasitansinya pada dasarnya merupakan komponen-komponen senyawa yang tergabung dalam sistem reaksi enzimatik antara wafer enzim dan substrat glukosa dalam *chamber* yang terhubung dengan LCR meter (tabel 5).

Tabel 5. Pembacaan nilai kapasitansi beberapa senyawa oleh alat LCR meter

	Sampel						
	Akuades	Glukosa (ppm)			Larutan H ₂ O ₂	Buffer fosfat 0,1 M pH 7	Asam Glukonat
		1000	100	10			
Rata-rata Nilai Kapasitansi (μF)	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	0,00 ±0,01	1,26 ±0,06	0,00 ±0,00

Berdasarkan hasil pembacaan nilai kapasitansi pada tabel 5 maka dapat dilihat bahwa hanya senyawa buffer fosfat 0,1 M pH 7 yang memberikan pembacaan pada alat LCR meter. Oleh karena itu dilakukan pengujian kerja alat lanjutan yaitu dengan mencampur buffer fosfat 0,1 M pH 7 dengan substrat glukosa berbagai macam konsentrasi (1000 ppm, 100 ppm, 10 ppm).

Tabel 6. Hasil pembacaan nilai kapasitansi campuran antara buffer fosfat 0,1 M pH 7 dengan glukosa berbagai variasi konsentrasi oleh alat LCR meter

	Sampel		
	Buffer fosfat 0,1 M pH 7 + Glukosa 1000 ppm	Buffer fosfat 0,1 M pH 7 + Glukosa 100 ppm	Buffer fosfat 0,1 M pH 7 + Glukosa 10 ppm
Rata-rata Nilai Kapasitansi (μF)	0,20 ±0,03	0,21 ±0,03	0,23 ±0,02

Pada pengukuran larutan buffer fosfat 0,1 M pH 7 didapatkan nilai kapasitansi yang tinggi, hal ini mungkin disebabkan terjadinya ionisasi dari masing-masing komponen buffer fosfat dimana nilai kapasitansi dari proses ionisasi tersebut memberikan pembacaan pada LCR meter.

Untuk tahapan verifikasi alat lebih lanjut, dilakukan juga pengukuran yang melibatkan reaksi antara enzim GOD bebas, enzim GOD terimobilisasi, dan juga kontrol. Pada tahapan verifikasi ini variasi konsentrasi glukosa yang digunakan yaitu 10 ppm, 100 ppm, dan 1000 ppm. Berikut adalah hasil pengukuran rata-rata kapasitansi enzim bebas, GOD terimobilisasi, dan kontrol terhadap berbagai variasi konsentrasi glukosa dengan 5 kali replikasi (Tabel 7)

Tabel 7. Hasil pengukuran nilai kapasitansi dari reaksi enzim GOD bebas, GOD terimobilisasi, dan kontrol (buffer fosfat 0,1 M pH 7) dengan berbagai variasi konsentrasi glukosa

		Rata-rata kapasitansi ± standar deviasi (μF)		
[glukosa] ppm		10	100	1000
Katalis				
Enzim GOD bebas		0,18 ± 0,03	0,17 ± 0,04	0,14 ± 0,04
GOD terimobilisasi	asam	0,24 ± 0,06	0,15 ± 0,03	0,20 ± 0,07
	surfaktan	0,2 ± 0,04	0,26 ± 0,02	0,23 ± 0,03
Kontrol (buffer fosfat 0,1 M pH 7)		0,20 ± 0,01	0,23 ± 0,03	0,15 ± 0,05

Saat dilakukan pengukuran nilai kapasitansi dari reaksi yang terjadi pada kontrol, enzim bebas, dan GOD terimobilisasi dengan berbagai variasi konsentrasi glukosa tidak terlihat adanya perbedaan nilai kapasitansi yang terbaca (Tabel 7). Hal ini juga ditegaskan dari hasil uji statistik yang dilakukan. Hasil uji statistik terhadap perubahan nilai kapasitansi yang dihasilkan, diketahui bahwa data tidak berdistribusi normal. Dengan demikian dilakukan uji statistik terhadap rata-rata perubahan nilai kapasitansi dari setiap perlakuan dengan metode *Friedman*. Hasil uji statistik dengan metode *Friedman* menunjukkan bahwa setiap perlakuan tidak menunjukkan adanya perbedaan signifikan.

Terdapat 2 kemungkinan yang menjadi faktor penyebab tidak adanya perbedaan pengukuran tersebut, yaitu kurang sempurnanya desain alat yang dibuat atau pengukuran yang belum tepat. Saat dilakukan pengukuran nilai kapasitansi dari suatu senyawa yang sama, nilai

kapasitansi yang terbaca oleh LCR meter terkadang berbeda dan tidak stabil. Nilai kapasitansi yang tidak stabil ini selain desain alat yang belum sempurna, mungkin disebabkan oleh faktor lain yang dapat mempengaruhi pembacaan nilai kapasitansi dari suatu komponen. Faktor tersebut antara lain frekuensi. Pada penelitian Huang *et al.* (2009), dilakukan pengukuran nilai kapasitansi yang dihasilkan dari glukosa konsentrasi 108 mg/dL dengan menggunakan berbagai variasi frekuensi. Hasil penelitian tersebut menunjukkan semakin tinggi frekuensi yang diberikan maka nilai kapasitansi yang terbaca juga semakin tinggi. Pada penelitian ini, alat yang digunakan tidak dapat menunjukkan frekuensi saat dilakukan pengukuran. Frekuensi gelombang yang melintas pada suatu ruangan dapat berubah-ubah. Frekuensi gelombang yang berubah-ubah ini yang mungkin dapat mempengaruhi pembacaan nilai kapasitansi saat dilakukan pengukuran. Pada penelitian Huang *et al.* (2009), juga ditunjukkan perubahan nilai kapasitansi bergantung waktu dengan berbagai variasi glukosa. Pada konsentrasi glukosa rendah, nilai kapasitansi yang terbaca oleh alat semakin tinggi, sebaliknya pada konsentrasi glukosa tinggi, nilai kapasitansi yang terbaca oleh alat semakin rendah. Pada penelitian ini saat dilakukan pengukuran nilai kapasitansi dari reaksi enzim GOD baik dalam bentuk enzim bebas maupun terimobilisasi terhadap glukosa berbagai variasi konsentrasi tidak menunjukkan adanya perbedaan.

Sebagai pembandingan dari pembacaan nilai kapasitansi (kerja alat), maka dilakukan pengukuran terhadap aktivitas enzim GOD bebas dan GOD terimobilisasi menggunakan metode DNS dengan kondisi yang sama seperti pengukuran menggunakan alat LCR meter. Berikut adalah hasil verifikasi tersebut (Tabel 8).

Tabel 8. Hasil pengukuran aktivitas enzim GOD bebas dan enzim GOD terimobilisasi (inkubasi 1 menit)

Sampel		Enzim GOD bebas	GOD terimobilisasi
[glukosa] awal (ppm)		475,87	475,87
[glukosa] sisa (ppm)	Replikasi 1	343,20	373,20
	Replikasi 2	345,20	373,20
	Replikasi 3	341,20	383,20
[glukosa] yang dikatalisis (ppm)	Replikasi 1	132,67	102,67
	Replikasi 2	130,67	102,67
	Replikasi 3	134,67	92,67
Aktivitas rata-rata ± standar deviasi (ppm/menit)		132,67 ± 2	99,33 ± 5,77

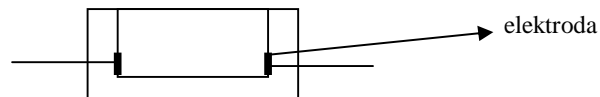
Pengukuran nilai kapasitansi pada penelitian ini dilakukan pada suhu ruang ketika LCR meter menunjukkan angka yang cukup stabil. Pada penelitian ini hal tersebut tercapai rata-rata pada waktu 1 menit. Untuk memverifikasi apakah dalam waktu 1 menit telah terjadi reaksi antara enzim GOD dengan substrat, maka dilakukan pengukuran aktivitas enzim GOD bebas dan enzim GOD terimobilisasi terhadap substrat glukosa 1000 ppm yang dilakukan pada suhu ruang dengan waktu inkubasi selama 1 menit. Hasil uji aktivitas menunjukkan bahwa dalam waktu 1 menit terjadi penurunan pada konsentrasi glukosa setelah penambahan enzim GOD bebas maupun enzim GOD terimobilisasi (Tabel 8). Hal ini juga dipertegas dari hasil uji statistik yang dilakukan. Hasil uji statistik terhadap konsentrasi glukosa awal, glukosa sisa enzim GOD bebas, dan glukosa sisa enzim GOD terimobilisasi menunjukkan data berdistribusi normal dan bersifat homogen. Dengan demikian dilakukan uji statistik dengan metode *One-Sample T-Test* terhadap glukosa sisa masing-masing enzim. Hasil uji statistik *One-Sample T-Test* menunjukkan bahwa terjadi penurunan signifikan pada konsentrasi glukosa setelah penambahan enzim (baik enzim GOD bebas maupun terimobilisasi). Dengan demikian dapat dikatakan dalam waktu 1 menit aktivitas enzim sudah dapat dideteksi.

Jika verifikasi menggunakan metode DNS dengan waktu inkubasi 1 menit dan

pengukuran dilakukan pada suhu ruang telah menunjukkan adanya reaksi yang dapat dideteksi, seharusnya pengukuran nilai kapasitansi menggunakan alat LCR meter juga memberikan perbedaan untuk setiap perlakuannya. Karena ketidakakuratan pembacaan nilai kapasitansi ini mungkin perlu dilakukan penyempurnaan kembali pada rancangan alat yang dibuat dan metode pengukurannya.

Uji penyempurnaan alat

Set peralatan LCR meter yang telah dibuat dan diuji pada percobaan di atas masih menunjukkan bacaan yang kurang stabil. Oleh karena itu perlu dilakukan penyempurnaan set peralatan LCR meter. Penyempurnaan yang dimaksud adalah pada desain chamber-nya. Untuk keperluan penyempurnaan ini, dilakukan sedikit perubahan terhadap posisi elektrodanya, yaitu berada di samping chamber (gambar 14).



Gambar 14. Sketsa tampak samping chamber yang disempurnakan

Selanjutnya dilakukan uji bacaan terhadap penyempurnaan alat tersebut. Hasilnya tidak menunjukkan perbedaan berarti dengan desain chamber sebelumnya (gambar 13).

G. KESIMPULAN

1. Konsentrasi selulosa asetat yang semakin tinggi (hingga konsentrasi 2%) tidak menghalangi substrat glukosa melewati membran. Semakin tinggi konsentrasi selulosa asetat mengakibatkan jumlah pori-pori membran menjadi semakin berkurang dan menjadi semakin rapat. Selain itu, variasi konsentrasi selulosa asetat juga mempengaruhi penampakan makroskopis dari membran yang dihasilkan (pada konsentrasi selulosa asetat yang lebih tinggi, membran yang dihasilkan cenderung menyerupai kertas plastik).
2. Pembuatan wafer enzim GOD terimobilisasi pada Ca-bentonit termodifikasi asam dengan penambahan PAH berbagai perbandingan rasio konsentrasi tidak mempengaruhi aktivitas wafer enzim, baik diukur dengan metode spektrofotometri (metode DNS) maupun menggunakan rancangan alat yang dibuat (LCR meter).
3. Pada percobaan ini rancangan alat yang dibuat untuk pembacaan nilai kapasitansi menggunakan alat LCR meter masih belum akurat.

Daftar Pustaka

1. Ad'anyi N, T'oth-Markus M, Szab'ó EE, V'aradi M, Sammartino MP, Tomassetti M and Campanella L, Investigation of organic phase biosensor for measuring glucose in flow injection analysis system. *Analytica Chimica Acta* 501:219–225 (2004).
2. Arief B., 2002, Metode Pillarisasi dan Interkalasi Lempung, *Jurnal Teknologi Industri dan Informasi*, vol. 3, No. 1, UBAYA, Surabaya, 35-42.
3. Atia, K.S. and AI El-Batal, Preparation of glucose oxidase immobilized in different carriers using radiation Polymerization, *J Chem Technol Biotechnol* 80:805–811 (2005)
4. Arief B., 2004, Pillarization of Natural Bentonite Clay Using Al and Fe Through CMC (*Carboxyl Methyl Cellulose*) Intercalation, *Prosiding Seminar Nasional Kimia, Universitas Gadjah Mada*, ISSN : 1410-8313, Oktober 2004.
5. Arief B., Hadiatni Rita, P., Yanti dan Dina Kartika, 2003, Pillarisasi bentonite Clay dan Aplikasinya dalam Penghilangan Warna pada Limbah Industri Tekstil, *Prosiding Seminar Nasional Teknik Kimia Indonesia 2003 di Yogyakarta*, ISBN : 979-97893-0-3, KR-17.

6. Arief Budhyantoro, Restu Kartiko Widi, Emma Savitri, Pillarisation of Natural Bentonite with Mixed Metal Fe-Al And Its Application in Chromium Ion Adsorption, 12th Asian Chemical Congress, Federation of Asian Chemical Societies, Kuala Lumpur, Malaysia., February 2007
7. Bonczek, J.L., Harris, W.G. and Kizza P.Nk., 2002, Monolayer to Bilayer Transitional Arrangements of Hexadecyltrimethylammonium Cations on Na-Montmorillonite, *Clays and Clay Minerals*, vol. 50, No. 1, 11-17.
8. Chung T. D., Jeong R., Kang S. K. and Kim H. C., 2001. Reproducible fabrication of miniaturized glucose sensors: preparation of sensing membranes for continuous monitoring. *Biosensors & Bioelectronics*, 16: 1079-1087
9. Davis, R.D., Gilman, J.W., Sutto, T.E., Callahan, J.H., Trulove, P.C. And De Long, H.C., 2004, Improved Thermal Stability Of Organically Modified Layered Silicates, *Clays and Clay Minerals*, Vol. 52, No. 2, 171-179.
10. Deng, Y., Dixon, J.B. And G. White, G. N., 2004, Intercalation And Surface Modification Of Smectite By Two Non-Ionic Surfactants, *Clays And Clay Minerals*, Vol. 51, No. 2, 150-161.
11. Gerard M., Chaubey A. and Malhotra B. D., 2002. Review: Application of conducting polymers to biosensors. *Biosensors and Bioelectronics*, 17 (5): 345-359
12. He. H., Frost, R.L., Deng, F., Zhu, J., Wen, X. And Yuan, P., 2004, Conformation Of Surfactant Molecules In The Interlayer Of Montmorillonite Studied By ¹³C Mas NMR, *Clays And Clay Minerals*, Vol. 52, No. 3, 350-356,
14. Imai, Y., Nishimura, S., Inukai, Y. And Tateyama, H., 2003, Differences In Quasicrystals of Smectite-Cationic Surfactant Complexes Due To Head Group Structure, *Clays And Clay Minerals*, Vol. 51, No. 2, 162-167.
15. J, Ferris, 2000, Clay-Catalyzed Polymerization Activity, *Artikel of Astrobiology, New York Centre for Student the Origin of Live*, USA.
16. Khaorapong, N., Kuroda, K. and Ogawa, M., 2002, Intercalation of 8-Hydroxyquinoline into Al-Smectites by Solid-solid Reaction, *Clays and Clay Minerals*, Vol. 50, NO. 4, 428-434.
17. Miao Yuqing, Chen Jianrong, Wu Xiaohua, 2006, Construction of a Glucose Biosensor by Immobilizing Glucose Oxidase within a Poly(ophenylenediamine) Covered Screen-printed Electrode, *Online Journal of Biological Sciences* 6 (1): 18-22,
18. Nakabayshi Y., Wakuda M. and Imai H., 1998. Amperometric glucose sensors fabricated by electrochemical polymerization of phenols on carbon paste electrodes containing ferrocene as an electron transfer mediator. *Analytical Sciences*, 14: 1069-1076
19. Polverejan, M., Pauly, R.T., and Pinnavaia, T., 2000, Acidic porous Clay Heerostructures (PCH) : Intragallery Assembly of Mesoporous Silica in Synthetic Saponite Clays, *Chem.Mater.*, Vol.12, 2698-2704.
20. Polverejan, M., Liu, Y., and Pinnavia T., 2002, Aluminated Derivatives of Porous Clay Heterostructures (PCH) Assembled from Synthetic Saponite Clay: Properties as Supermicroporous to Small Mesoporous Acid Catalysts, *Chem.Mater.*, Vol.14, 2283-2288.
21. Restu Kartiko Widi, Arief Budhyantoro, Effect of HDTMA on Pillarisation of Bentonite with Metal Fe And Its Application in Copper Ion Adsorption, 12th Asian Chemical Congress, Federation of Asian Chemical Societies Kuala Lumpur, Malaysia (accepted, February 2007)
22. Sanjay, G., S. Sugunan, Invertase immobilised on montmorillonite: reusability enhancement and reduction in leaching, *Catalysis Communications* 6 (2005) 81-86
23. Sarath Babu VR, Kumarb MA, Karanth NG and Thakur MS, Stabilization of immobilized glucose oxidase against thermal inactivation by silanization for biosensor applications, *Biosensors and Bioelectronics* 19:1337-1341(2004).
24. Sarikaya, Y., Önal M., Baran, B. and Alemdaroğlu, T., 2000, The Effect of Treatment on Some The Physicochemical Properties of a Bentonite, *Clays and Clay Minerals*, Vol. 48, No. 5, 557-562.
25. Shpeizer, B.G., Sylveste, P., Cahllil, R.A. and Clearfield, A., 1999, Nickel Oxide Interstratified and Pillared α -Zirconium Phosphate, *Chem. Mater*, Vol. 11, American Chemical Society, 1201 - 1209.
26. Slade, P.G., And Gates, W.P., 2004, The Ordering of HDTMA In The Interlayers Of Vermiculite And The Influence of Solvents, *Clays And Clay Minerals*, Vol. 52, No. 2, 204-210.
27. Tsuge H, Natsuakai O and Ohashi K, Purification, properties and molecular features of glucose oxidase from *Aspergillus niger*. *J Biochem* 78:835-843 (1975).
28. Vasant R. Choudary, Suman K. Jana, Nilesh S. Patil, 2001, *Catal. Lett.* Vol. 76, no. 3-4, pp. 235-239
29. Vasilios, G., Dimitrios, G. and Dimitrios, P., 2001, Organo-Clay Derivatives in the Synthesis of Macrocycles, *WILEY-VCH Verlag GmbH, Weinheim, Nederland*.
30. Vroemen, A.J. 2003. *Handbook of Food Enzymology: Glucose Oxidase*. Delft: DSM Food Specialities.

31. Weiss, Z.K., Škvařil, M.V., Králová, M., Čížková, P. And Pospíšil, M., 2004, Intercalation And Grafting Of Vermiculite With Octadecylamine Using Low-Temperature Melting, *Clays And Clay Minerals*, Vol. 51, No. 5, 555-565.
32. Whitaker, J.R., A.G.J. Voragen, D.W.S Wong. 2003. *Handbook of Food Enzymology*. Marcel Dekker, Inc. New York
33. Zhu, H.Y. and Max Lu, G.Q., 2001, Engineering The Structure of Nanoporous Clays with Micelles of Alkyl Polyether Surfactants, *Langmuir*, 17, 588-594.