

LAPORAN PENELITIAN PERINTIS

KAJIAN AWAL PREPARASI KOMPOSIT ENZIM
GLUKOSA OKSIDASE - BENTONIT TERMODIFIKASI
TMAOH



Oleh:

Restu Kartiko Widi, S.Si., M.Si., Ph.D

**Fakultas Teknik
Jurusan Teknik Kimia
Universitas Surabaya**

Agustus 2017

HALAMAN PENGESAHAN

1. a. Judul Penelitian : Kajian awal preparasi Komposit Enzim Glukosa Oksidase - Bentonit Termodifikasi TMAOH
b. Bidang Ilmu : Sains
2. Ketua Peneliti
a. Nama Lengkap : Restu Kartiko Widi, S.Si., M.Si., Ph.D
b. Jenis Kelamin : Laki-laki
c. Gol/ NPK : IVa/199024
d. Jab. fungsional : Lektor Kepala
e. Jab. struktural : Ketua Departemen MIPA
f. Fakultas/jurusan : Teknik/Teknik Kimia
g. Telp/Faks : 031-2981398
h. email : restu@staff.ubaya.ac.id
3. Jumlah anggota peneliti : -
a. Nama Anggota Peneliti :
4. Lokasi Penelitian : Lab. Kimia Universitas Surabaya
5. Kerjasama dengan Institusi lain : -
6. Lama Penelitian : 9 bulan
7. Waktu Penelitian : Desember 2016 s.d. September 2017
8. Biaya yang diperlukan : Rp. 5.000.000,-
9. Sumber Dana
a. Sumber dari Depdiknas : -
b. Sumber dari Univ. Surabaya : Rp. 5.000.000,-
c. Sumber lain : -
Jumlah : Rp. 5.000.000,-

Surabaya, 1 Agustus 2017

Menyetujui,
Dekan Fakultas Teknik



(Dr. Dra. Amelia, M.T)
NPK: 193015

Peneliti,

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

HALAMAN PENGESAHAN

1. a. Judul Penelitian : Kajian awal preparasi Komposit Enzim Glukosa Oksidase - Bentonit Termodifikasi TMAOH
b. Bidang Ilmu : Sains
2. Ketua Peneliti
a. Nama Lengkap : Restu Kartiko Widi, S.Si., M.Si., Ph.D
b. Jenis Kelamin : Laki-laki
c. Gol/ NPK : IVa/199024
d. Jab. fungsional : Lektor Kepala
e. Jab. struktural : Ketua Departemen MIPA
f. Fakultas/jurusan : Teknik/Teknik Kimia
g. Telp/Faks : 031-2981398
h. email : restu@staff.ubaya.ac.id
3. Jumlah anggota peneliti : -
a. Nama Anggota Peneliti :
4. Lokasi Penelitian : Lab. Kimia Universitas Surabaya
5. Kerjasama dengan Institusi lain : -
6. Lama Penelitian : 9 bulan
7. Waktu Penelitian : Desember 2016 s.d. September 2017
8. Biaya yang diperlukan : Rp. 5.000.000,-
9. Sumber Dana
a. Sumber dari Depdiknas : -
b. Sumber dari Univ. Surabaya : Rp. 5.000.000,-
c. Sumber lain : -
Jumlah : Rp. 5.000.000,-

Surabaya, 1 Agustus 2017

Menyetujui,
Dekan Fakultas Teknik



(Dr. Dra. Amelia, M.T.)
NPK: 193015

Peneliti,

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



DAFTAR ISI

	Halaman
Halaman Judul	i
Halaman Pengesahan	ii
Daftar Isi	iii
RINGKASAN	iv
BAB I. PENDAHULUAN	1
<i>1.1. Latar Belakang</i>	2
<i>1.2. Rumusan Masalah</i>	2
BAB II. STUDI PUSTAKA	2
BAB III. METODE PENELITIAN	5
BAB IV. HASIL DAN PEMBAHASAN	6
BAB V. KESIMPULAN	9
DAFTAR PUSTAKA	9
LAMPIRAN	12

RINGKASAN

Saat ini pemanfaatan enzim glukosa oksidase (GOD) sebagai biosensor untuk mendeteksi gula darah manusia makin berkembang. Penelitian dilakukan melalui pembuatan matriks imobilisasi enzim GOD menggunakan bentonit termodifikasi oleh perlakuan asam dan interkalasi surfaktan. Bentonit termodifikasi ini diharapkan dapat menjadi sebuah matriks imobilisasi yang dapat dipergunakan untuk memerangkap enzim glukosa oksidase (GOD)

Suatu model komposit enzim dapat dikembangkan dengan memanfaatkan polimer konduktif yang berperan sebagai transduser dan akan memperkuat signal elektrokimia dari wafer enzim. Signal elektrokimia wafer enzim yang ditimbulkan oleh elektron yang dihasilkan dari reaksi enzimatik dibaca oleh alat LCR meter sebagai nilai kapasitansi. Pada penelitian ini, wafer enzim dibuat dengan berbagai variasi rasio konsentrasi Ca-bentonit:PAH yaitu 1:0, 1:1, 1:2 dan 1:3. Pengaruh penambahan polimer PAH berbagai rasio konsentrasi juga dipelajari dengan mengukur nilai kapasitansi oleh LCR meter dan nilai aktivitas menggunakan metode DNS. Selain itu juga akan dibuat sebuah membran selulosa asetat dengan berbagai variasi konsentrasi (0,5%, 1%, 1,5% dan 2%). Hasil penelitian menunjukkan bahwa penambahan PAH memberikan pengaruh terhadap aktifitas enzim, yang ditunjukkan dengan semakin menurunnya harga kapasitansinya.

Dengan dihasilkannya matriks komposit bentonit termodifikasi ini diharapkan dapat meningkatkan nilai bentonit alam sebagai imobilisator berkinerja tinggi dengan harga yang relatif lebih murah dibandingkan matriks lainnya. Matriks bentonit termodifikasi ini juga diharapkan dapat dengan mudah diaplikasikan sebagai biosensor alat pengukur kadar glukosa, dan harganya lebih murah jika diproduksi massal.

Kata kunci: Glukosa oksidase, Tetrametilamonium Hidroksida, Polialilamin Hidroklorida, LCR meter, Membran selulosa asetat

BAB 1. PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Enzim adalah suatu katalis biologis, yaitu suatu senyawa protein yang dapat mengkatalisis reaksi biologis dalam tubuh manusia, hewan maupun tumbuhan. Kebanyakan enzim diberi nama menurut reaksi yang dikatalisisnya, dan seringkali diberi akhiran –ase. Enzim memiliki berat molekul mulai dari 12.000 – 120.000 bahkan ada yang lebih tinggi. Enzim kebanyakan bekerja dalam tubuh makhluk hidup pada suhu normal tubuh dan dalam media berair.

Pada beberapa dekade yang lalu ide untuk melakukan reaksi enzimatik pada media *non-aqueous* sepertinya merupakan ide yang hampir mustahil untuk mewujudkannya. Namun dalam kurun waktu beberapa tahun terakhir pendekatan pemanfaatan enzim untuk mengkatalisis berbagai proses kimia dalam media organik telah banyak dilakukan. Masalah yang paling sering muncul pada aplikasi reaksi enzimatik seperti ini adalah adanya pengaruh media organik terhadap aktifitas enzim. Interaksi secara langsung antara enzim dengan media organik mempengaruhi konformasi aktifitas enzim sehingga dapat menurunkan aktifitasnya. Imobilisasi enzim merupakan salah satu metode yang paling menjanjikan untuk mencegah penurunan aktifitas enzim dalam pelarut organik (Elena *et al.*, 2005).

Imobilisasi enzim didefinisikan sebagai enzim-enzim yang secara fisik berada dalam suatu tempat/lokasi tertentu sehingga tidak bebas bergerak, namun tidak kehilangan aktifitas katalisisnya, dan dapat digunakan secara berulang (Chibata, 1978). Dengan karakteristiknya yang masih seperti enzim asalnya memberikan keunggulan tersendiri terhadap proses imobilisasi tersebut, yaitu enzim dapat digunakan dalam proses katalisis secara berulang dan berkesinambungan.

Salah satu enzim yang sering menjadi perhatian adalah enzim *glucose oxidase* (GOD) berkenaan dengan pemanfaatannya yang besar dalam reagen pendiagnosa penyakit, biosensor, zat aditif makanan dan sebagainya (Iwuoha *and* Smyth, 1994; Larreta-Garde *et al.*, 1987; Raba *and* Motolla, 1995). Beberapa tahun belakangan ini uji yang melibatkan imobilisasi enzim GOD telah banyak dilakukan. Salah satu yang menjadi perhatian utama dalam uji tersebut adalah stabilitas enzim dalam pelarut organik dan pada suhu tinggi (Mozhaev *et al.*, 1989). Pemanfaatan imobilisasi enzim memberikan peluang untuk meningkatkan stabilitas enzim pada konsentrasi pelarut organik yang tinggi. Imobilisasi mencegah interaksi protein-protein yang dapat menyebabkan terjadinya agregasi molekul protein sehingga pada akhirnya menyebabkan timbulnya deaktivasi enzim (Vasileva *and* Godjevargova, 2005).

Berdasarkan proyeksi World Health Organization, diperkirakan dalam kurun waktu 30 tahun (1995-2025), jumlah penderita diabetes di negara berkembang akan meningkat sebesar 170%. Dari persentase tersebut, jumlah penderita diabetes di Indonesia akan meningkat dari 5 juta penderita menjadi 12 juta penderita yang akan termasuk dalam daftar 10 negara dengan jumlah penderita diabetes terbesar (Hasnah, 2009). World Health Organization (WHO) menyatakan bahwa Indonesia menempati urutan keenam di dunia sebagai negara dengan jumlah penderita diabetes terbanyak setelah India, China, Uni Soviet, Jepang dan Brazil. Belakangan ini, permintaan akan peralatan diagnostik yang mampu mendeteksi munculnya gejala-gejala penyakit mematikan semakin meningkat. Fenomena ini menjadi salah satu faktor yang mendorong dikembangkannya teknologi biosensor. Salah satu jenis biosensor yang secara komersial sukses di pasaran adalah *disposable glucose biosensor*. Alat biosensor glukosa memiliki pangsa pasar yang mencapai 85% dari keseluruhan pasar biosensor dunia (Wang, 2008). Hal ini menjadikan biosensor glukosa sebagai model yang tepat bagi penelitian dan pengembangan biosensor ke depannya.

Pengukuran kadar gula darah menggunakan *disposable glucose biosensor* yang biasa disebut glukonometer banyak dijual di apotik maupun toko obat. Alat ini memiliki beberapa kelemahan yaitu alat tersebut umumnya masih diimpor sehingga harga per tes-nya menjadi mahal, akurasi dan presisinya kurang karena banyak pengotor yang menginterferensi pengukuran. Ketidakakuratan pembacaan ini dapat membahayakan pasien karena hasil tes kadar gula darah ini dipakai sebagai dasar pemberian insulin, sementara itu pemberian insulin dengan dosis yang terlalu tinggi akan menyebabkan kematian.

Untuk mengatasi kelemahan yang ada pada alat pendeteksi gula darah komersial, maka pada penelitian ini akan dibuat sebuah model wafer enzim yang tersusun dari tiga lapisan, berturut-turut dari atas ke bawah, yaitu lapisan membran selulosa asetat, enzim glukosa oksidase terimobilisasi pada Ca-bentonit termodifikasi surfaktan dan polimer PAH (*Poly-Allylamine Hydrochloride*). Diharapkan biosensor yang dibuat berdasarkan model wafer enzim tersebut dapat meningkatkan kinerja alat dalam mengukur kadar gula darah manusia.

Untuk meningkatkan keakurasian alat maka dapat digunakan sebuah membran selulosa asetat. Membran seleksi ini berfungsi untuk menyaring substrat kompleks sehingga senyawa yang terlibat dalam reaksi enzimatik hanya glukosa yang terdapat dalam darah. Enzim glukosa oksidase yang digunakan diimobilisasikan pada matriks Ca-bentonit termodifikasi surfaktan TMAOH (*Tetramethylammonium hydroxide*) 5%. Berdasarkan Wuisan (2012), bentonit termodifikasi TMAOH 5% mampu mengimobilisasi enzim glukosa oksidase dengan persentase terimobilisasi yang tinggi berkisar 82% hingga 88%.

Hal penting lain yang perlu diperhatikan dalam perancangan biosensor adalah kecepatan transfer produk (elektron) dari permukaan enzim ke permukaan elektroda. Transfer ini harus secepat mungkin untuk memberikan respon pengukuran yang cepat dan akurat. Hal ini dapat diatasi dengan penggunaan sebuah polimer bermuatan. Polimer yang digunakan dalam penelitian ini adalah PAH (*Poly-Allylamine Hydrochloride*) yang merupakan jenis polikation. *Conducting polymer* dapat berfungsi untuk menangkap elektron yang dihasilkan dari reaksi redoks enzim sehingga dapat memperkuat signal elektrokimia yang dibaca oleh alat (Gao *et al.*, 2011). Signal elektrokimia yang dihasilkan berupa nilai kapasitansi dan dapat dibaca oleh alat LCR meter. Sebagai tambahan, juga dilakukan uji terhadap alat untuk menguji keakuratan pembacaan alat yang telah dibuat.

1.2 Rumusan Masalah

1. Bagaimanakah pengaruh konsentrasi selulosa asetat terhadap kemampuan substrat melewati membran, penampakan mikroskopis serta penampakan makroskopis?
2. Berapa rasio konsentrasi terbaik antara enzim GOD terimobilisasi pada Ca-bentonit termodifikasi surfaktan dan polimer PAH sehingga menghasilkan aktivitas wafer enzim yang optimum?
3. Bagaimanakah keakuratan pembacaan nilai kapasitansi dari rancangan alat yang dibuat?

BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

Lapisan-lapisan bentonit tersusun atas tetrahedral silikat (SiO_4) pada bagian luar dan octahedral AlO_6 pada bagian dalamnya. Adanya struktur polimer silika-alumina tersebut, lempung (*clay*) memiliki muatan permukaan negatif (dan mempunyai sifat keasaman yang cukup tinggi) sehingga memiliki kemampuan untuk mengikat kation dan molekul air. Untuk meningkatkan kemampuan mengikat molekul organik pada lempung guna meningkatkan nilai tambahnya, beberapa peneliti telah melakukan beberapa usaha

antara lain menginterkalasi lempung dengan molekul organik (kationik, anionik dan non ionik molekul). Proses ini mengakibatkan jarak antar lapisan lempung menjadi lebih besar, sehingga lempung cenderung membentuk pori berukuran meso (20-60 Å). Akibatnya lempung memiliki sifat selektifitas yang baik terhadap molekul berukuran besar, terutama molekul organik. (Cool and Vansant; Polverejan, 2000; Moreno *et.al.*, 1999; Hutson *et.al.*, 1999; Khaorapapong *et.al.*, 2002; He *et.al.*, 2004; Davis *et.al.*, 2004; Slade and Gates, 2004).

Beberapa peneliti memanfaatkan lempung hasil interkalasi sebagai katalis. Selain itu juga telah ada peneliti yang memanfaatkan jenis lempung montmorillonite K-10 sebagai bahan pemerangkap enzim invertase (Sanjay dan Sugunan, 2005).

Salah satu jenis enzim yang banyak mendapat perhatian adalah enzim *glucose oxidase* (GOD). GOD adalah enzim yang banyak dimanfaatkan dalam biosensor glukosa. Enzim GOD umumnya diisolasi dari *Penicillium* dan *Aspergillus* dengan kurva aktivitas berkisar pada pH 4,5-7,5 dan suhu 30-60 °C. Peningkatan suhu sampai 70 °C akan menurunkan aktivitasnya dan tidak ada aktivitas pada suhu 80 °C (Whittaker *et al.*, 2003). Denaturasi termal GOD seringkali disebabkan oleh ketidakstabilan interaksi ionik-hidrofobik dan putusannya ikatan hidrogen, gaya Van der Waals dan interaksi ionik yang selanjutnya mengakibatkan perubahan konformasi struktur tersier enzim sehingga mengakibatkan berkurangnya atau bahkan hilangnya aktifitas enzim GOD (Sarath *et al.*, 2004; Tsuge *et al.*, 1975). Oleh karena itu, bagaimana enzim GOD terikat dengan bahan pengimobilisasinya sangat berperan dalam proses imobilisasi dan aktifitasnya.

Enzim Glukosa Oksidase (GOD)

Glukosa oksidase (GOD) (EC1.1.3.4) adalah enzim yang mengkatalisis oksidasi β-D-glukosa menjadi glukonolakton yang kemudian dengan adanya molekul air akan terhidrolisis menjadi asam glukonat dan peroksida. Reaksi oksidasi β-D-glukosa oleh enzim GOD dapat dituliskan sebagai berikut (Vroeman, 2003):

GOD

β-D-glukosa + FAD → β-D-glukonolakton + FADH₂

β-D-glukonolakton + H₂O → Asam D-glukonat

FADH₂ + O₂ → H₂O₂ + FAD

β-D-glukosa + H₂O + O₂ → Asam-D glukonat + H₂O₂

Gambar 2.2 Reaksi oksidasi β-D-glukosa oleh enzim glukosa oksidase

Sumber: Glucose Oxidase (2003)

Glukosa oksidase ditemukan pertama kali oleh Muller. Muller menemukan enzim tersebut di *Aspergillus niger* dan *Penicillium glaucum*. Pada tahun 1928, Muller mempublikasikan bahwa enzim tersebut mengkatalisis oksidasi glukosa menjadi asam glukonat dengan keberadaan oksigen terlarut. Pada tahun yang sama, Bernhauer menyimpulkan bahwa konversi glukosa menjadi asam glukonat oleh *A.niger* disebabkan oleh enzim glukosidase.

Tetrametilamonium hidroksida (TMAOH) adalah suatu garam ammonium kuarterner dengan rumus molekul (CH₃)₄NOH. Pada umumnya TMAOH yang paling sering dijumpai adalah dalam bentuk terlarut yang terkonsentrasi dalam air atau metanol. Bentuk padat dan larutannya tidak berwarna atau kekuning-kuningan (tidak murni). Meskipun TMAOH hampir tidak memiliki bau ketika murni, namun seringkali masih tercium bau amis dari pengotor trimetilamina. TMAOH banyak diaplikasikan dalam industri sebagai pewarna tekstil serta terus diteliti dalam skala laboratorium untuk memaksimalkan bioproses industri.

Proses interkalasi lempung akan menyebabkan penambahan jarak interlayer. Proses ini dilakukan dengan metode pertukaran kation yang berada pada kisi interlayer. Penyisipan kation ke dalam kisi *interlayer* menyebabkan berkurangnya interaksi solid-solid (ikatan Van Der Waals) antara permukaan lapisan lempung. Penyisipan kation seperti surfaktan akan mengubah sifat interlayer lempung yang alaminya bersifat hidrofilik menjadi hidrofobik. Dengan

demikian, senyawa non polar dan molekul *low-water-soluble* organik dapat diserap pada interlayer lempung (Moyo, 2009).

Penggunaan enzim terimobilisasi memiliki beberapa keuntungan diantaranya enzim dapat digunakan secara berulang, proses dapat dihentikan secara cepat dengan mengeluarkan enzim dari larutan, kestabilan enzim dapat diperbaiki, larutan hasil proses tidak terkontaminasi oleh enzim dan dapat digunakan untuk tujuan analisis (Messing, 1976). Tujuan utama dari imobilisasi enzim adalah penggunaan ulang enzim untuk banyak kali siklus reaksi. Karakteristik matriks yang digunakan untuk imobilisasi berperan penting dalam mempengaruhi aktivitas enzim terimobilisasi. Idealnya, matriks pengimobil memiliki sifat yang resisten terhadap kompresi, inert, *biocompatible*, resisten terhadap serangan mikroba, dan tersedia dalam harga yang murah. Matriks yang digunakan dapat berupa organik maupun inorganik. Pada aplikasinya dalam industri lebih banyak digunakan matriks organik daripada inorganik (Guisan, 2006).

Penentuan kadar protein dapat dilakukan dengan berbagai metode yang tergantung dari jenis sampel serta ketersediaan alat dan bahan. Metode yang umum digunakan adalah metode Kjeldahl, Lowry dan Biuret. Analisis protein dapat dilakukan dengan dua metode secara kualitatif terdiri atas reaksi Xantoprotein, reaksi Hopkins-Cole, reaksi Millon, reaksi Nitroprusida dan reaksi Sakaguchi. Secara kuantitatif terdiri dari metode Kjeldahl, metode titrasi formol, metode Lowry, metode Biuret.

Metode uji Lowry untuk mengukur jumlah total protein pertama kali dipublikasikan di jurnal biokimia. Pengukurannya berdasarkan metode kolorimetri menggunakan ion tembaga dan reagen folin-Ciocalteau untuk grup fenol. Pengujian terus dilakukan untuk melihat bagaimana suatu senyawa menjadi pengganggu dalam reaksi. Literatur yang berhubungan dengan tes ini secara komprehensif ditinjau oleh Peterson (1983). Protokol ini menjelaskan versi Hartree tentang uji Lowry. Versi ini menggunakan tiga macam reagen, menghasilkan warna yang lebih jelas (peningkatan sensitivitas) dengan beberapa protein, mempertahankan respon linier selama rentang konsentrasi yang lebih besar (30% hingga 40%).

Polimer konduktif telah banyak digunakan sebagai transduser dalam *biosensors* beberapa tahun terakhir ini. Beberapa kelebihan dari penggunaan polimer konduktif adalah ketersediaannya dalam bermacam-macam monomer, dapat dipreparasi secara kimiawi maupun elektrokimiawi, dapat dipersiapkan dalam berbagai bentuk larut dan tidak terlarut, kompatibel dengan beragam teknik fabrikasi seperti elektrokimia, optik, berbasis massa dan sebagainya, dan yang terakhir adalah biomaterial seperti enzim, antibodi, sel utuh, dan asam nukleat dapat diperangkap didalam matriks polimer (Arshak et al., 2009).

Polielektrolit adalah jenis polimer yang memiliki muatan di sekeliling permukaannya dan bersifat elektrolit. Polielektrolit ini akan terdisosiasi dalam larutan (air) dan menjadikan polimer ini bermuatan. Sifat-sifat polielektrolit memiliki kemiripan dengan garam elektrolit dan polimer (senyawa dengan berat molekul besar) sehingga seringkali disebut juga *polysalt* (Ramdhani, 2008).

Sama halnya seperti asam maupun basa, polielektrolit juga ada yang kuat dan ada yang lemah. Polielektrolit kuat adalah polielektrolit yang dapat terdisosiasi sempurna dalam larutan pada nilai pH berapapun. Salah satu bahan polielektrolit yang telah banyak digunakan dalam pengembangan sensor dan biosensor melalui teknik *layer-by-layer* adalah poly-allyamine hydrochloride (PAH). Bahan tersebut merupakan polielektrolit kation lemah dengan banyak gugus amina terionkan di bagian *backbone*-nya dan terprotonasi sempurna dalam larutan netral atau asam. Pada umumnya, kation polielektrolit ini dikombinasikan dengan polielektrolit anionik untuk membuat lapisan multilayer. PAH memiliki berat molekul yang bervariasi berkisar antara 15.000-70.000 g/mol. Monomer yang terdapat pada PAH ini sekitar 576 ($n \approx 576$) (Ramdhani, 2008).

Penelitian ini akan mengoptimalkan sifat dasar bentonit yaitu keasaman permukaannya dan meningkatkan ukuran pori bentonit sampai di ukuran meso (20 – 60 Å), untuk digunakan sebagai bahan pengimobilisasi enzim dengan menyerap molekul enzim

dalam pori bentonit, sehingga diharapkan molekul enzim (dalam hal ini adalah enzim GOD) tidak mudah terlepas atau berkurang selama proses katalitiknya, namun tidak menyebabkan molekul enzim kehilangan aktifitasnya. Kemudian matriks yang diperoleh akan digabungkan dengan polimer dan bahan lain untuk menghasilkan suatu komposit yang diharapkan aktif dalam membantu hidrolisis glukosa dengan mengukur kapasitansinya. Hal ini dijadikan sebagai dasar dalam pembuatan material biosensor penentuan kadar glukosa dalam darah. Perbedaan mendasar dari penelitian yang diusulkan dengan penelitian terdahulu baik yang telah dilakukan oleh pengusul maupun peneliti lain adalah terletak pada proses interkalasi lempung, surfaktan yang digunakan, sumber bentonit, serta pemanfaatannya sebagai bahan imobilisasi enzim GOD. selain itu juga dalam pemanfaatannya sebagai material komposit sebagai dasar pembuatan biosensor glukosa.

BAB 3. METODE PENELITIAN

Penelitian ini akan dibagi menjadi dua tahapan. Tahap pertama adalah modifikasi bentonit alam. Pada bagian ini dilakukan proses interkalasi bentonit alam dengan kation molekul surfaktan TMA-OH (Tri Methyl Ammonium Hidroksida) dilanjutkan dengan pembentukan komposit dengan penambahan polimer pada matriks. Tahap kedua adalah karakterisasi material dan uji aktifitas hidrolasenya dengan mengukur kapasitansinya.

1. Interkalasi kation organik pada bentonit alam

Dalam proses ini interkalasi dilakukan dengan mencampur larutan surfaktan dan suspensi bentonit, dimana rasio bentonit : Vol. larutan surfaktan = 1gr : 50 ml, sedangkan variasi konsentrasi surfaktan yang digunakan adalah antara 0,75% sampai 5% (b/V). Pada kajian ini digunakan surfaktan Trimethylammonium Bromida (TMA-Br). Campuran diaduk selama 5 jam, kemudian dicuci, disaring dan dikeringkan. Hasil interkalasi ini selanjutnya disebut sebagai suspensi bentonit-organik yang akan digunakan pada proses pillarisasi tidak langsung.

2. Imobilisasi enzim GOD menggunakan bentonit termodifikasi

Proses imobilisasi enzim GOD dilakukan dengan mencampurkan bentonit termodifikasi dalam jumlah setara dengan bufer pospat 0,1 M dan larutan enzim GOD. Campuran diaduk menggunakan *water bath shaker* selama 1 jam, dan selanjutnya dilakukan pemisahan menggunakan *centrifuge* pada 1°C selama 1 jam. Protein enzim dianalisis menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Kemudian menghitung jumlah enzim yang *leaching* (lepas dari matriks) yang dilakukan dengan membilas larutan enzim terimobilisasi menggunakan demineralised water, kemudian dianalisis kadar protein dalam cairan hasil bilasan menggunakan metode Bradford

Karakterisasi dilakukan menggunakan metode (i) FT-IR, untuk mengetahui gugus dan perubahan ikatan kimia (ii) difraksi sinar-X, untuk penentuan awal perubahan struktur kristal bentonit.

3. Pembuatan Komposit Enzim

Wafer enzim dibuat dengan variasi rasio konsentrasi Ca-bentonit:PAH yaitu 1:0, 1:1, 1:2, 1:3. Misalnya untuk membuat rasio konsentrasi Ca-bentonit:PAH sebesar 1:1 maka sebanyak 300 µl suspensi enzim GOD terimobilisasi Ca-bentonit dalam tabung *eppendorf* ditambahkan larutan PAH sebanyak 300 µl kemudian campuran dihomogenkan dan diinkubasi pada suhu ruang selama 2 jam. Campuran disentrifugasi selama 7 menit pada suhu 4°C, kecepatan 13.000 rpm. Supernatan dibuang dan pelet dilarutkan dengan menambahkan 300 µl buffer fosfat 0.1 M

pH 7 (volume awal suspensi enzim). Wafer enzim dengan variasi rasio konsentrasi Ca-bentonit:PAH kemudian digunakan untuk pengukuran dengan alat LCR meter, spektrofotometri DNS serta analisa FTIR.

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

Nilai kapasitansi dari hasil reaksi enzimatik didapatkan dengan mencampurkan 100 µl wafer enzim (1:0, 1:1, 1:2, 1:3) dengan 100 µl substrat glukosa 1000 ppm dalam *chamber* yang telah dihubungkan dengan alat LCR meter dengan *range* 20 µF pada suhu ruang. Dilakukan pencatatan nilai kapasitansi pada saat penambahan wafer enzim dan setelah penambahan substrat, maka akan diperoleh selisih nilai kapasitansi yang merupakan nilai kapasitansi hasil reaksi enzimatik selama 1 menit yang terbaca oleh alat LCR meter.

BAB 4. RESULT AND DISCUSSION

Preparation of cellulose acetate membrane

Cellulose acetate membrane is used for filtering the sample so that only glucose substrate can be passing through to wafer enzyme. The obtained membrane from the variation of concentration of cellulose acetate is tested its permeability and its microscopic and macroscopic sight (Table 1 and fig.1-2).

Table 1. Permeability, microscopic and macroscopic sight of cellulose acetate membranes

Parameters	Concentration of cellulose acetate				
	Control (initial)	0.5%	1%	1.5%	2%
Permeability Glucose concentration (ppm)	501	497.5	492.3	490.4	485.7
Microscopic sight ^{*)} Pores diameter (small)		4	3	2	1
Pores distribution (inhomogeneous)		3	2	1	4
Macroscopic sight ^{*)} Surface texture (smooth)		2	3	4	1
Strictness (rigid)		4	3	2	1
Thinness (thin)		1	2	3	4

^{*)} number 1 – 4 is the rank (not the scale), (example: for pores diameter number 1 is the smallest one)

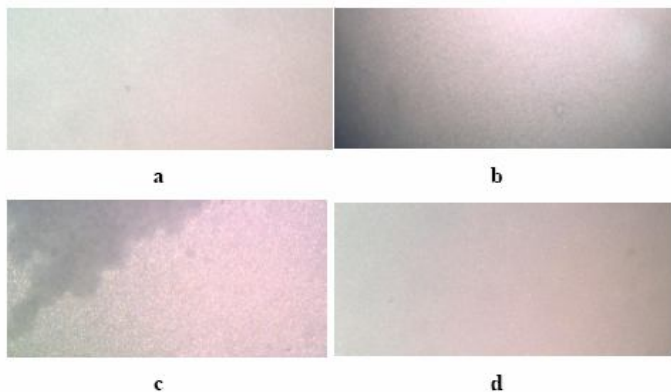


Fig. 1. Microscopic sight cellulose acetate membranes (a: 0.5%, b: 1%, c: 1.5%, d: 2%) (100 x magnification)

Table 1 depicts that glucose substrate could pass through the membranes obtained from all variation of the initial concentration of cellulose acetate. However, the highest amount of glucose that can pass through is shown by 0.5% cellulose acetate membranes. It might be because of this membrane has the biggest pore diameter so that more glucose molecule can pass through it. The higher concentration of cellulose acetate the denser of the membrane is. It causes the pores diameter of the membrane to be smaller.

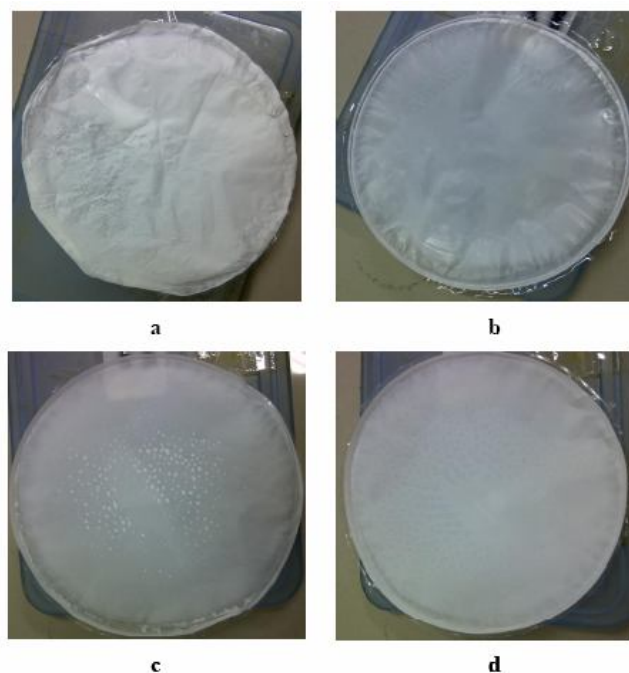


Fig. 2. Macroscopic sight cellulose acetate membranes (a: 0.5%, b: 1%, c: 1.5%, d: 2%)

From fig. 1 and 2 it can be shown that 0.5% cellulose acetate membranes have very smooth texture and very good pore distribution. The membrane from 0.5% cellulose acetate would use as substrate filter for development of wafer enzyme.

Activity test of immobilized and free GOx

In this study, GOx enzyme was immobilized on modified bentonite using 5% TMAH. The result of immobilized GOx is described in table 2.

Table 2. Percentage of Immobilized GOx on 5% TMAH-modified bentonite

Replication	Initial GOx concentration (IU/ml)	Immobilized GOx (IU/ml)	% Immobilization
I	54.3	41.9	77.2
II	56.9	42.8	75.2
III	54.9	42.2	76.9

This result indicates that the immobilization GOx using 5% TMAH give stable and consistent result. The addition of TMAH into bentonite leads increasing the distance of bentonite layer. This is due to ammonium cation from TMAH exchange with potassium and magnesium cation in the bentonite. As a consequence, modified bentonite has higher affinity to organic molecules. It causes the GOx molecules can recline easily into the bentonite pores, and then they form interaction to shape immobilized GOx structure.

The free and immobilized GOx enzyme activities can be seen in fig. 3. The data shows that the activity of immobilized GOx enzyme is lower than that of free GOx enzyme. The decreasing of the activity is about 32.5%. The immobilization process may leads to the conformational changes of the GOx, and moreover it also causes some GOx molecules covered by surfactant molecules in the layer of bentonite, which may decrease its affinity and accessibility of substrate molecules thus cause decreasing of enzyme activity [5].

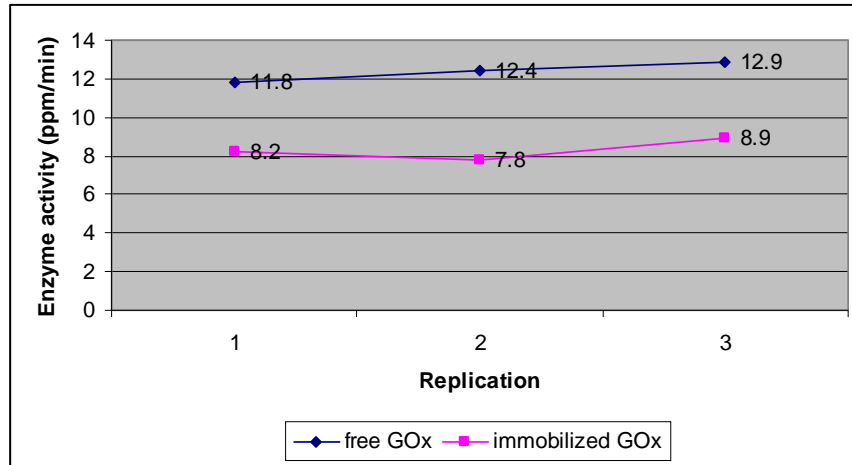


Fig.3. The activity of free and immobilized GOx enzyme

Preparation of immobilized GOx wafer enzyme

The main composition of pre-designed device is a wafer. This wafer consists of membranes, immobilized GOx and PAH. This section describes the effect of molar ratio of immobilized GOx:PAH toward the enzyme activity (fig.4) and its capacitance values (fig.5).

The addition of the polymer (PAH) plays a role in increasing of the stability of immobilized GOx enzyme. The data shows that by increasing of molar ratio of PAH, the GOx enzyme activity is decrease (fig.4). This probably because of increasing the number of PAH molecules lead to increase the steric hindrance around the sites active of the enzyme which may hinder the substrate molecule interact with the enzyme. As a consequence, the glucose molecule which may oxidize is less.

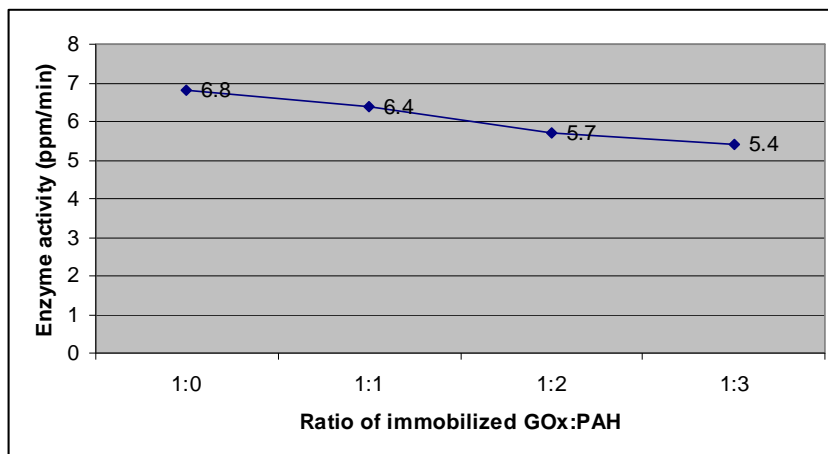


Fig.4. Effect of ratio of immobilized GOx and PAH toward enzyme activity

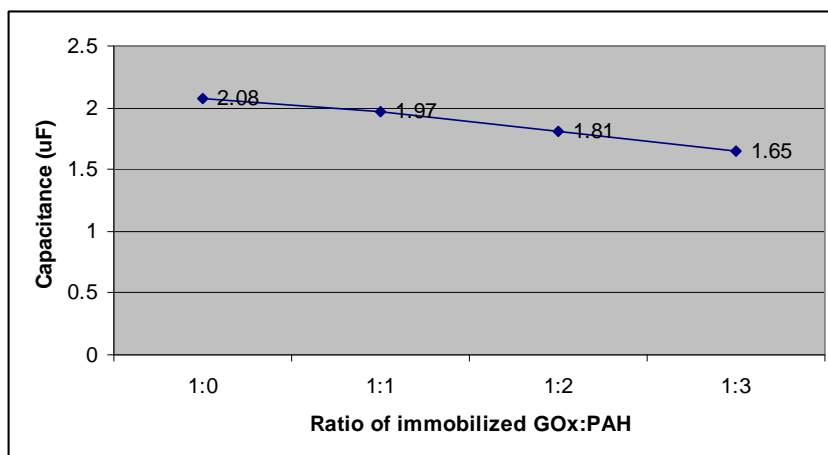


Fig.5. Effect of ratio of immobilized GOx and PAH toward wafer capacitance

The addition of the polymer (PAH) also plays a role in increasing of the conductivity of GOx enzyme. During the process the substrates oxidize to form gluconic acid and peroxide, and moreover there are some electrons involved in this reaction. The transfer of the electrons can be detected by LCR meter to give its capacitance. The electrons from the reaction is caught by the PAH and then pass through into dielectric solution which leads to increased the conductivity. The conductivity value is contrary with capacitance value. Thus, the more substrate oxidizes, the more electrons involved the lower capacitance is. It is very clearly described in fig.5.

BAB V. Conclusion

In this paper, immobilized glucose oxidase wafer enzyme on Ca-bentonite modified by TMAH has been presented. GOx can be immobilized successfully and still show very good activity. The wafers consist of membrane, immobilized GOx and PAH have also been successfully prepared and show its activity. Increasing of molar ratio of PAH, the GOx enzyme activity is decrease. The present work demonstrates the existence promising applications of immobilized glucose oxidase wafer enzyme on Ca-bentonite modified by TMAH as a health device.

DISSEMINASI

Penelitian ini merupakan pendukung untuk penelitian yang didanai dari hibah Penelitian Berbasis Kompetensi Ristekdikti tahun 2017. Hasil penelitian telah diterima untuk dipublikasikan pada IOP Material Science and Engineering tahun 2017 (*in press*). Cuplikan *proof read* artikel tersebut terlampir pada halaman lampiran.

Daftar Pustaka

1. Ad'anyi N, T'oth-Markus M, Szab'o 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. 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)
3. 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 (2007)
4. 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.
5. Chibata, I., "Immobilized Enzymes. Research and Development", Wiley, New York, 1978.
6. Cirpan, A., S. Alkan, L. Toppare, Y. Hepuzer, Y. Yagci, *Bioelectrochemistry* 59 (2003) 29.

7. 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.
8. 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.
9. Elena A. Markvicheva, Vladimir I. Lozinsky, Fatima M. Plieva, Konstantin A. Kochetkov, Lev D. Rumsh, Vitali P. Zubov, Jyotirmoy Maity, Rajesh Kumar, Virinder S. Parmar, and Yury N. Belokon, Gel-immobilized enzymes as promising biocatalysts: *Pure Appl. Chem.*, Vol. 77, No. 1, pp. 227–236, 2005.
10. 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. <http://www.tekmira.esdm.go.id>, diakses pada April 2017
15. 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.
16. Isik, S., S. Alkan, L. Toppare, I. Cianga, Y. Yagci, *Eur. Polym. J.* 39 (2003) 2375.
17. Iwuoha EI and Smyth MR, Reactivity of a glucose oxidase electrode in a polar organic solvent. *Anal Proc Incl AnalCommun* 31:19–21 (1994).
18. J, Ferris, 2000, Clay-Catalyzed Polymerization Activity, *Artikel of Astrobiology, New York Centre for Student the Origin of Live, USA.*
19. Khaorapapong, 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.
20. Laane C, Boeren S, Vos Kand Veeger C, Rules for optimization of biocatalysis in organic solvents, *Biotechnol Bioeng* 30:81–87 (1987).
21. Polverejan, M., Pauly, R.T., and Pinnavaia, T., 2000, Acidic porous Clay Heterostructures (PCH) : Intragallery Assembly of Mesoporous Silica in Synthetic Saponite Clays, *Chem.Mater.*, Vol.12, 2698-2704.
22. 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.
23. Raba, J., Mottola, H.A. 1995. Glucose Oxidase as an Analytical Reagent. *Critical Reviews in Analytical Chemistry Vol 25(1):1–42*
24. 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)
25. Sanjay, G., S. Sugunan, Invertase immobilised on montmorillonite: reusability enhancement and reduction in leaching, *Catalysis Communications* 6 (2005) 81–86
26. 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).
27. 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.
28. 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.
29. Trevan, M.D., "Immobilized Enzymes. An Introduction and Applications in Biotechnology", Wiley, New York, 1980.
30. US Patent no. 6495511 (2001), Patent Storm, issued on December 17, 2001
31. Vasant R. Choudary, Suman K. Jana, Nilesh S. Patil, 2001, *Catal. Lett.* Vol. 76, no. 3-4, pp. 235-239
32. Vasileva N and Godjevargova Ts, Study of the effect of some organic solvents on the activity and stability of glucose oxidase. *Materials Science and Engineering C25:17–21* (2005).
33. Vasiliou, G., Dimitrios, G. and Dimitrios, P., 2001, Organo-Clay Derivatives in the Synthesis of Macrocycles, *WILEY-VCH Verlag GmbH, Weinheim, Nederland.*
34. Weiss, Z.K., Š Kova', M.V., Kr' I' Stkova', M., C' Apkova', P. And Pospi' Š' Il, M., 2004, Intercalation And Grafting Of Vermiculite With Octadecylamine Using Low-Temperature Melting, *Clays And Clay Minerals*, Vol. 51, No. 5, 555.565.
35. Whitaker, J.R., A.G.J. Voragen, D.W.S Wong. 2003. *Handbook of Food Enzymology.* Marcel Dekker, Inc. New York
36. Worsfold P. J. ., Iupac Classification And Chemical Characteristics Of Immobilized Enzymes, *Pure & Appl. Chem.*, Vol. 67, No. 4, pp. 597-600, 1995.

37. Zhu, H.Y., Vansant, E.F. and Max Lu, G.Q., 1999, Development of Composite Adsorbents of Carbon and Intercalated Clay for N₂ and O₂ Adsorption: A Preliminary Study, *Jour. Of Colloid and Interface Science, Vol.210*, 352-359.
38. 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.
39. E. Katz, A. N. Shipway, I. Willner, 2004 in *Nanoparticles: From Theory to Applications* (Ed.: G. Schmid), Wiley-VCH, Weinheim, Germany
40. E.I. Iwuoha and M.R. Smyth 1994 Reactivity of a glucose oxidase electrode in a polar organic solvent, *Anal. Proc.* 31 19
41. K.S. Atia and Al El-Batal 2005 *Preparation of glucose oxidase immobilized in different carriers using radiation polymerization*, *J. Chem. Technol. and Biotechnol.* 80 805
42. J. Ma, L. Zhang, Z. Liang, W. Zhang, Y. Zhang, 2007 Monolith-based immobilized enzyme reactors: Recent developments and applications for proteome analysis, *J. Sep. Sci.* 30 3050
43. Chrisnasari, R., Z.G. Wuisan, A. Budhyantoro, R.K. Widi, 2015 *Glucose Oxidase Immobilization On TMAH-Modified Bentonite*, *Indones. J. Chem.* 15 22
44. D. J. Shirale, V. K. Gade, P. D. Gaikwad, H. J. Kharat, K. P. Kakde, P. A. Savale, S. S. Hussaini, N. R. Dhumane and M. D. Shirsat, 2005 *Transactions of the SAEST* 40 128
55. J. C. Vidal, J. Espuelas, E. Garcia-Ruiz and J-R. Castillo, 2004 *Talanta* 64 655
56. P. D. Gaikwad, D. J. Shirale, V. K. Gade, P. A. Savale, H. J. Kharat, K. P. Kakde, S. S. Hussaini, N. R. Dhumane and M. D. Shirsat, 2006 *Bull. Mater. Sci.* 29 169
57. D. J. Shirale, V. K. Gade, P. D. Gaikwad, H. J. Kharat, K. P. Kakde, P. A. Savale, S. S. Hussaini, N. R. Dhumane and M. D. Shirsat. 2006 *Mater. Lett.* 60 1407
58. D. J. Shirale, V. K. Gade, P. D. Gaikwad, H. J. Kharat, K. P. Kakde, P. A. Savale, S. S. Hussaini, N. R. Dhumane and M. D. Shirsat 2006 *Int. J. Electrochem. Sci.*, 1 62
59. M. D. Shirsat 2005 *Microwaves and Optoelectronics*, Anshan Tunbridge Wells UK 455
60. M. D. Shirsat 2005 *Microwaves and Optoelectronics*, Anshan Tunbridge Wells UK 459
61. J. D. Newman and A. P. F. Turner, 2005 *Biosens. Bioelectron.* 20 2435
62. F. Arslan, S. Ustabaş and H. Arslan, 2011 An Amperometric Biosensor for Glucose Determination Prepared from Glucose Oxidase Immobilized in Polyaniline-Polyvinylsulfonate Film *Sensors* 11 8152
63. Yoo, E.-H.; Lee, S.-Y. 2010 Glucose biosensors: An overview of use in clinical practice. *Sensors* 10 4558
64. Norouzi, P.; Faridbod, F.; Larijani, B.; Ganjali, M.R. 2010 Glucose biosensor based on MWCNTs-Gold nanoparticles in a Nafion film on the glassy carbon electrode using flow injection FFT continuous cyclic voltammetry. *Int. J. Electrochem. Sci.* 5 1213
65. Shan, D.; Wang, S.; He, Y.; Xue, H. 2008 Amperometric glucose biosensor based on *in situ* electropolymerized polyaniline/poly (acrylonitrile-co-acrylic acid) composite film. *Mater. Sci. Eng. C* 28 213

Preparation of Immobilized Glucose Oxidase Wafer Enzyme on Calcium-Bentonite Modified By Surfactant

R. K. Widi¹, D.C. Trisulo², A. Budhyantoro¹, R. Chrisnasari²

¹ Department of Chemical Engineering, University of Surabaya, TG Building 5th floor Jln. Raya Kalirungkut, Surabaya60293, Indonesia

² Department of Biology, University of Surabaya, FG Building 2nd floor Jln. Raya Kalirungkut, Surabaya60293, Indonesia

E-mail: restu@staff.uibaya.ac.id

Abstract. Wafer glucose oxidase (GOx) enzymes was produced by addition of PAH (Poly-Allyamine Hydrochloride) polymer into immobilized GOx enzyme on modified-Tetramethylammonium Hydroxide (TMAH) 5%-Calcium-bentonite. The use of surfactant molecul (TMAH) is to modify the surface properties and pore size distribution of the Ca-bentonite. These properties is very important to ensure GOx molecules can be bound on the Ca-bentonit surface to be immobilized. The addition of the polymer (PAH) is expected to lead the substrates to be adsorbed onto the enzyme. In this study, wafer enzymes were made in various concentration ratio (Ca-bentonite : PAH) which are 1:0, 1:1, 1:2 and 1:3. The effect of PAH (Poly-Allyamine Hydrochloride) polymer added with various ratios of concentrations can be shown from the capacitance value on LCR meter and enzyme activity using DNS method. The addition of the polymer (PAH) showed effect on the activity of GOx, it can be shown from the decreasing of capacitance value by increasing of PAH concentration.

Keyword: Glucose oxidase, immobilization, poly-allyamine hydrochloride, capacitance

1. Introduction

Biocatalysis of redox enzymes has fascinated escalating attention for development of electronic biomaterials and devices for industrial, clinical and environmental applications [1]. One of the enzymes which are being extensively used is glucose oxidase (GOx). The GOx is widely used as a reagent in medical diagnostics [2,3], especially to determination of glucose in blood. However a major problem with the enzymatic methods is the high cost of the enzyme itself. Immobilized enzyme technology has been used to solve the problem [4]. Tests involving immobilized GOx have been used quite frequently in recent year, and one of the tests is immobilized GOx using surfactant-modified bentonite [5].

The method of sol-gel entrapment of biomolecules is a very promising technique of immobilization for biosensors construction, because of its simplicity, low temperature of the process, large amount and low leakage of entrapped material. When the sol-gel technique is used to construct the optical biosensors, the conditions of the process must allow obtaining transparent gels. A simple enzyme electrode can be obtained by immobilization of oxidase on the surface of oxygen electrode. The oxygen concentration depletion is proportional to the concentration of oxidase substrate. Local changes of oxygen concentration caused by enzymatic reaction are measured by oxygen electrode.

Enzyme immobilization matrix using polymer for the development of biosensors has been investigated by many researchers [6-8]. Conducting polymers are capable of incorporating different functionalities in their matrix during or after polymerization. The properties of synthesized polymer films are affected by electropolymerization condition. Many results of the synthesis of polymer films which can be used as a polymer matrix for immobilization of biocomponents have been reported [9,10]. Various conducting polymers have been considered for immobilization of enzymes [11,12]. Amperometric enzymatic electrodes based on GOx, which generates hydrogen peroxide in the presence of oxygen and glucose, are the most widely used for the measurement of blood glucose concentration. Several biosensors with the enzymatic method have been reported [13-17].

However, still it is essential to continue the research in this field with new material and approach, so that the sensitivity and stability of the sensor can be improved. In the present study, we used Ca-bentonite modified by Tetramethylammonium Hydroxide (TMAOH) as an immobilizer. We also used Poly-Allyamine Hydrochloride (PAH) as a polymer GOx matrix. The use of surfactant molecule (TMAH) is to modify the surface properties and pore size distribution of the Ca-bentonite. These properties is very important to ensure GOx molecules can be bound on the Ca-bentonit surface to be immobilized. The addition of the polymer (PAH) is expected to lead the substrates to be adsorbed onto the enzyme.

2. EXPERIMENTAL

Reagents: The enzyme glucose oxidase (GOD) from *Aspergillusniger* (273 U/mg) was obtained from NacalaiTesque, Ca-bentonit from Pacitan, Indonesia, TMAOH 25%wt (E. Merck), *Dinitrosalicylic Acid* (Sigma-Aldrich), *Sodium sulfite* (E. Merck), D-Glucose p.a. (NacalaiTesque), cellulose acetate (Sigma-Aldrich), PAH (*Poly-Allyamine Hydrochloride* MW 15.000) (Sigma-Aldrich), reagent Folin-Ciocalteau (E. Merck).

Apparatus: amperometric (capacitance) measurement was carried out with LCR meter (DEKKO).

Preparation of Immobilized GOx Wafer Enzyme: The preparation was divided into two steps; *first step* was preparation of immobilized GOx wafer enzyme in vary of Ca-bentonite:PAH (1:0, 1:1, 1:2, 1:3). The immobilization of GOx was followed the procedure which was described more detailed before [5]. To obtain Tetramethylammonium Hydroxide (TMAH) modified bentonite, 250 mL of several concentrations of TMAH solution (in range 0-5%) were heated until 75 °C and 5 g of bentonite was gradually added to it. Mixtures of heated TMAH solution and bentonite suspension were refluxed for 5 h. The solid phase was separated by filtration and washed with distilled water until the pH become 7.0 to remove the unabsorbed TMAH. The TMAH modified bentonite was dried overnight at a temperature of 100 °C. The modified bentonite powder was sieved with a 140 mesh sieve and the



UNIVERSITAS SURABAYA
LEMBAGA PENELITIAN DAN PENGABDIAN KEPADA MASYARAKAT

Gedung Perpustakaan Lantai 4 - Jalan Raya Kalirungkut (Tenggilís), Surabaya, 60293
Telp. (031) 2981360, 2981365 | Fax. (031) 2981373 | website: lppm.ubaya.ac.id | e-mail: lppm@unit.ubaya.ac.id

SURAT TUGAS

Nomor : 052/Lit/LPPM-01/FT/VI/2016

Atas dasar proposal Penelitian Perintis dari Fakultas Teknik, dan Surat Perjanjian Pelaksanaan Penugasan Penelitian Internal Universitas Surabaya Gelombang I Tahun Anggaran 2016 – 2017 Nomor: 001/SP-Lit/LPPM-01/Int/FT/XII/2016 tanggal 01 Desember 2016, dengan ini Ketua Lembaga Penelitian dan Pengabdian Kepada Masyarakat Universitas Surabaya memberi tugas kepada:

Restu Kartiko Widi, S.Si., M.Si., Ph.D.

untuk melaksanakan penelitian sesuai proposal dengan judul:

Kajian Awal Preparasi Komposit Enzim Glukosa Oksidase - Bentonit Termodifikasi TMAOH.

dengan waktu pelaksanaan penelitian selama 10 bulan terhitung mulai tanggal 1 Desember 2016 sampai dengan tanggal 30 September 2017 (sesuai dengan Surat Perjanjian Pelaksanaan Penugasan Penelitian Internal Universitas Surabaya), dengan anggaran sebesar Rp. 5.000.000,- (Lima Juta Rupiah), dengan rincian terlampir dan hasil akhir diwujudkan:

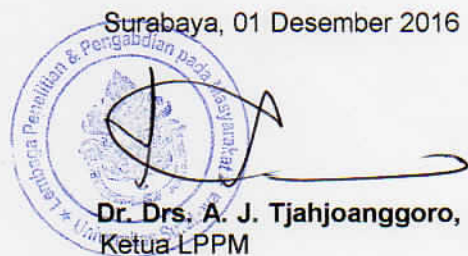
1. *Hard copy* laporan hasil penelitian (2 eksemplar) dan *soft copy* dalam format PDF diserahkan ke LPPM Ubaya
2. Laporan keuangan dengan bukti-bukti pengeluaran yang asli (1 eksemplar)
3. Ringkasan hasil penelitian atau abstraksi penelitian (untuk database)
4. Hasil penelitian berupa: Produk ipteks-sosbud (metode, teknologi tepat guna, blueprint, prototype, sistem, kebijakan, model, rekayasa sosial); dan publikasi dalam jurnal ilmiah terakreditasi atau jurnal ilmiah bereputasi internasional.

Penerima tugas **WAJIB** mengikuti segala aturan yang dikeluarkan oleh LPPM Universitas Surabaya.

Demikian Surat Tugas ini dibuat untuk dilaksanakan sebaik-baiknya.

Mengetahui,

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

Surabaya, 01 Desember 2016

Dr. Drs. A. J. Tjahjoanggoro, M.Si.
Ketua LPPM

Tembusan :

1. Dekan Fakultas Teknik Ubaya,
2. Direktur Keuangan Ubaya,
3. Direktur SDM Ubaya,
4. Yang bersangkutan.



UNIVERSITAS SURABAYA
LEMBAGA PENELITIAN DAN PENGABDIAN KEPADA MASYARAKAT

Gedung Perpustakaan Lantai 4 - Jalan Raya Kalirungcut (Tenggilis), Surabaya, 60293
Telp. (031) 2981360, 2981365 | Fax. (031) 2981373 | website: lppm.ubaya.ac.id | e-mail: lppm@unit.ubaya.ac.id

Anggaran Penelitian

Judul : **Kajian Awal Preparasi Komposit Enzim Glukosa Oksidase - Bentonit Termodifikasi TMAOH.**

Nomor : 052/Lit/LPPM-01/FT/VI/2016

NO.	URAIAN	JUMLAH (Rp.)	KETERANGAN
1.	Honorarium Peneliti	-	-
2.	Bahan Habis Pakai dan Peralatan	4.750.000,-	Sesuai bukti pengeluaran
3.	Biaya Perjalanan	-	-
4.	Biaya Lain-Lain	250.000,-	Sesuai bukti pengeluaran
	Total	5.000.000,-	

KETERANGAN :

- Jumlah penggunaan dana penelitian untuk masing-masing kelompok sesuai dengan yang dianggarkan maksimal (tidak dapat dipertukarkan)
- Proses penelitian terkait data (Entri data, Analisis data dan lain-lain) yang dilakukan oleh peneliti **tidak mendapatkan honor** tersendiri.

Surabaya, 01 Desember 2016



Dr. Drs. A. J. Tjahjoanggoro, M.Si.
Ketua LPPM



UNIVERSITAS SURABAYA
LEMBAGA PENELITIAN DAN PENGABDIAN KEPADA MASYARAKAT

Gedung Perpustakaan Lantai 4 - Jalan Raya Kalirungkut (Tenggilis), Surabaya, 60293
Telp. (031) 2981360, 2981365 | Fax. (031) 2981373 | website: lppm.ubaya.ac.id | e-mail: lppm@unit.ubaya.ac.id

SURAT PERJANJIAN PELAKSANAAN PENUGASAN
PENELITIAN INTERNAL UNIVERSITAS SURABAYA
GELOMBANG I TAHUN ANGGARAN 2016 - 2017
NO: 001/SP-Lit/LPPM-01/Int/FT/XII/2016

Pada hari ini **Kamis** tanggal **Satu** bulan **Desember** tahun **Dua Ribu Enam Belas**, kami yang bertanda tangan di bawah ini:

1. **Dr. Drs. A.J. Tjahjoanggoro, M.Si.** : Ketua LPPM Universitas Surabaya, yang selanjutnya dalam Surat Perjanjian ini disebut sebagai **PIHAK PERTAMA**.

2. **Restu Kartiko Widi, S.Si., M.Si., Ph.D.** : Dosen Universitas Surabaya, dalam hal ini bertindak sebagai pengusul dan ketua peneliti Penelitian Internal Universitas Surabaya Tahun Anggaran 2016-2017; untuk selanjutnya disebut **PIHAK KEDUA**.

PIHAK PERTAMA dan **PIHAK KEDUA** secara bersama-sama bersepakat mengikatkan diri dalam suatu Perjanjian Pelaksanaan Penugasan Penelitian Internal Universitas Surabaya dengan ketentuan dan syarat-syarat sebagaimana diatur dalam Pasal-pasal sebagai berikut:

Pasal 1

- (1) **PIHAK PERTAMA** memberi tugas kepada **PIHAK KEDUA**, dan **PIHAK KEDUA** menerima tugas tersebut untuk melaksanakan Penelitian Internal Perintis dengan judul Kajian Awal Preparasi Komposit Enzim Glukosa Oksidase - Bentonit Termodifikasi TMAOH.
- (2) **PIHAK KEDUA** bertanggungjawab penuh atas pelaksanaan, administrasi, dan keuangan atas pekerjaan sebagai dimaksud pada ayat (1) dan berkewajiban menyerahkan semua bukti-bukti pengeluaran serta dokumen pelaksanaan lainnya dalam bendel laporan yang tersusun secara sistematis kepada **PIHAK PERTAMA**.
- (3) Pelaksanaan Penugasan Penelitian Internal Universitas Surabaya sebagaimana dimaksud pada ayat (1) didanai dari Universitas Surabaya Kode Anggaran 2307.



UNIVERSITAS SURABAYA

LEMBAGA PENELITIAN DAN PENGABDIAN KEPADA MASYARAKAT

Gedung Perpustakaan Lantai 4 - Jalan Raya Kalirungkut (Tenggilis), Surabaya, 60293
Telp. (031) 2981360, 2981365 | Fax. (031) 2981373 | website: lppm.ubaya.ac.id | e-mail: lppm@unit.ubaya.ac.id

Pasal 2

- (1) **PIHAK PERTAMA** menyerahkan dana untuk penelitian sebagaimana dimaksud dalam Pasal 1 sebesar **Rp. 5.000.000,- (Lima Juta Rupiah)** yang berasal dari Universitas Surabaya Kode Anggaran 2307.
- (2) Dana pelaksanaan penelitian sebagaimana dimaksud pada ayat (1) dibayarkan oleh **PIHAK PERTAMA** kepada **PIHAK KEDUA** secara bertahap dengan ketentuan sebagai berikut:
 - a) Pembayaran Tahap Pertama sebesar 70% dari total bantuan dana penelitian yaitu $70\% \times \text{Rp. 5.000.000,-} = \text{Rp. 3.500.000,-}$ (**Tiga Juta Lima Ratus Ribu Rupiah**)
 - b) Pembayaran Tahap Kedua/Terakhir sebesar 30% dari total bantuan dana penelitian yaitu $30\% \times \text{Rp. 5.000.000,-} = \text{Rp. 1.500.000,-}$ (**Satu Juta Lima Ratus Ribu Rupiah**), dibayarkan setelah **PIHAK KEDUA** menyerahkan Laporan Akhir ke LPPM Universitas Surabaya selambat-lambatnya **30 September 2017**
 - c) **PIHAK KEDUA** bertanggungjawab mutlak dalam pembelanjaan dana tersebut pada ayat (1) sesuai dengan proposal yang telah disetujui dan berkewajiban untuk menyerahkan kepada **PIHAK PERTAMA** semua bukti-bukti pengeluaran sesuai jumlah dana yang diberikan oleh **PIHAK PERTAMA**.
 - d) **PIHAK KEDUA** berkewajiban mengembalikan sisa dana yang tidak dibelanjakan kepada **PIHAK PERTAMA** untuk disetor ke Universitas Surabaya.
- (3) Dana Penugasan sebagaimana dimaksud dalam ayat (1) dibayarkan kepada **PIHAK KEDUA** melalui rekening yang diajukan dan atas nama **PIHAK KEDUA**.

Pasal 3

- (1) Apabila **PIHAK KEDUA** selaku ketua peneliti sebagaimana dimaksud pada Pasal 1 tidak dapat melaksanakan Penugasan Penelitian Internal Universitas Surabaya Tahun 2016-2017, maka **PIHAK KEDUA** wajib mengusulkan pengganti ketua peneliti yang merupakan salah satu anggota tim kepada **PIHAK PERTAMA**.
- (2) Perubahan terhadap susunan tim peneliti Penugasan Penelitian Internal Universitas Surabaya dapat dibenarkan apabila telah mendapat persetujuan tertulis dari Lembaga Penelitian dan Pengabdian kepada Masyarakat Universitas Surabaya.
- (3) Apabila **PIHAK KEDUA** tidak dapat melaksanakan tugas dan tidak ada pengganti ketua peneliti sebagaimana dimaksud dalam Pasal 1 maka **PIHAK KEDUA** harus



UNIVERSITAS SURABAYA
LEMBAGA PENELITIAN DAN PENGABDIAN KEPADA MASYARAKAT

Gedung Perpustakaan Lantai 4 - Jalan Raya Kalirungkut (Tenggilis), Surabaya, 60293
Telp. (031) 2981360, 2981365 | Fax. (031) 2981373 | website: lppm.ubaya.ac.id | e-mail: lppm@unit.ubaya.ac.id

mengembalikan dana 100% yang telah diterima kepada **PIHAK PERTAMA** yang selanjutnya disetor ke Universitas Surabaya.

- (4) Bukti setor sebagaimana dimaksud pada ayat (3) disimpan oleh kepada **PIHAK PERTAMA**.

Pasal 4

- (1) **PIHAK KEDUA** harus menyampaikan laporan telah menyelesaikan seluruh pekerjaan yang dibuktikan dengan menyerahkan Laporan Akhir dan Laporan Penggunaan Anggaran 100% Penelitian Internal Universitas Surabaya dalam bentuk *hardcopy* kepada LPPM Universitas Surabaya selambat-lambatnya **30 September 2017** dokumen dibawah ini:
- a) Laporan Akhir sebanyak 2 (dua) eksemplar dengan ketentuan sebagai berikut:
 - i. Dijilid rapi dan cover berwarna (Skim penelitian perintis menggunakan cover warna kuning, dan skim penelitian kompetitif menggunakan cover warna putih).
 - ii. Halaman pengesahan dibubuhi tanda tangan Dekan Fakultas dan disertakan stempel basah Fakultas.
 - b) Laporan Penggunaan Anggaran 100% sebanyak 1 (satu) eksemplar disertai rekapitulasi anggaran dan nota asli dengan ketentuan sebagai berikut:
 - i. Dijilid rapi dan cover berwarna (Skim penelitian perintis menggunakan cover warna kuning, dan skim penelitian kompetitif menggunakan cover warna putih).
 - ii. Mengetahui Dekan Fakultas dengan dibuktikan tanda tangan Dekan Fakultas dan disertakan stempel basah Fakultas.
- (2) **PIHAK KEDUA** berkewajiban menyerahkan Laporan Akhir Penelitian Internal Universitas Surabaya dalam bentuk *softcopy* (PDF) kepada LPPM Universitas Surabaya selambat-lambatnya **30 September 2017**.
- (3) Apabila sampai dengan batas waktu yang telah ditetapkan untuk melaksanakan Penelitian Internal Universitas Surabaya telah berakhir, **PIHAK KEDUA** belum menyelesaikan tugasnya maka **PIHAK KEDUA** berkewajiban memberikan informasi kepada LPPM Universitas Surabaya melalui surat resmi mengetahui Dekan Fakultas dengan dibuktikan tanda tangan Dekan Fakultas dan disertakan stempel basah Fakultas, dilampirkan 1 (satu) eksemplar laporan kemajuan paling lambat tanggal **14 September 2017**. Perpanjangan Batas Waktu Penelitian Internal Ubaya yang diberikan maksimal 6 (enam) bulan.



UNIVERSITAS SURABAYA
LEMBAGA PENELITIAN DAN PENGABDIAN KEPADA MASYARAKAT

Gedung Perpustakaan Lantai 4 - Jalan Raya Kalirungkut (Tenggilis), Surabaya, 60293
Telp. (031) 2981360, 2981365 | Fax. (031) 2981373 | website: lppm.ubaya.ac.id | e-mail: lppm@unit.ubaya.ac.id

Pasal 5

- (1) Apabila **PIHAK KEDUA** maupun anggota peneliti masih melakukan Penelitian Internal Universitas Surabaya, maka **PIHAK KEDUA** maupun anggota peneliti tidak dapat mengajukan Penelitian Internal Universitas Surabaya yang baru sampai Penelitian Internal Universitas Surabaya sebelumnya selesai.
- (2) Apabila **PIHAK KEDUA** maupun anggota peneliti telah melakukan Penelitian Internal Universitas Surabaya dalam kurun waktu 2 atau 3 tahun sebanyak 2 kali, maka **PIHAK KEDUA** maupun anggota peneliti tidak dapat melakukan Penelitian Internal Universitas Surabaya untuk sementara. Dapat melakukan Penelitian Internal Universitas Surabaya kembali setelah melakukan penelitian dari luar Universitas Surabaya.

Pasal 6

PIHAK PERTAMA berkewajiban menentukan jadwal pelaksanaan untuk monitoring dan evaluasi dan/atau seminar oleh reviewer dari luar Universitas Surabaya yang ditunjuk oleh **PIHAK PERTAMA**, setelah selesainya Laporan Penelitian Internal Universitas Surabaya Gelombang 1 dan Gelombang 2.

Pasal 7

- (1) Kekayaan Intelektual yang dihasilkan dari Pelaksanaan Penugasan Penelitian Internal Universitas Surabaya tersebut diatur dan dikelola sesuai dengan peraturan dan perundang-undangan yang berlaku di Universitas Surabaya.
- (2) Hasil Penelitian Internal Universitas Surabaya berupa peralatan dan/atau alat yang dibeli dari penelitian ini wajib diserahkan ke Lembaga Penelitian dan Pengabdian kepada Masyarakat Universitas Surabaya, karena peralatan dan/atau alat tersebut adalah milik Universitas Surabaya yang dapat dihibahkan kepada Unit/Fakultas melalui Surat Keterangan Hibah.

Pasal 8

- (1) Apabila terjadi perselisihan antara **PIHAK PERTAMA** dan **PIHAK KEDUA** dalam pelaksanaan perjanjian ini akan dilakukan penyelesaian secara musyawarah dan mufakat, dan apabila tidak tercapai penyelesaian secara musyawarah dan mufakat maka penyelesaian dilakukan melalui proses hukum.



UNIVERSITAS SURABAYA
LEMBAGA PENELITIAN DAN PENGABDIAN KEPADA MASYARAKAT

Gedung Perpustakaan Lantai 4 - Jalan Raya Kalirungkut (Tenggilis), Surabaya, 60293
Telp. (031) 2981360, 2981365 | Fax. (031) 2981373 | website: lppm.ubaya.ac.id | e-mail: lppm@unit.ubaya.ac.id

(2) Hal-hal yang belum diatur dalam perjanjian ini diatur kemudian oleh kedua belah pihak.

Pasal 9

Surat Perjanjian Penugasan Pelaksanaan Program Penelitian ini dibuat rangkap 2 (dua).

PIHAK PERTAMA

PIHAK KEDUA



Dr. Drs. A.J. Tjahjoanggoro, M.Si.
NPK. 188008



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