

## Detection Limit Of Carbamate Pesticides Biosensors Based Enzyme Acetylcholinesterase And Cholin Oxidase On Platinum Electrode

Mashuni<sup>1)</sup>, W. Wahab<sup>2)</sup>, A. Ahmad<sup>2)</sup>, M. Syahrul<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup> Department of Chemistry , Faculty of Mathematics and Natural Sciences, Haluoleo University

<sup>2)</sup> Department of Chemistry , Faculty of Mathematics and Natural Sciences, Hasanuddin University

### Abstract

The presence of carbamate pesticides in environmental and food poses a potential hazard to human health and there is a growing interest in their rapid and accurate determination for food safety and environmental monitoring. The aim of this research is to design electrochemical biosensor for analyzing carbamate pesticides residue in food material. Acetylcholinesterase (AChE) and cholin oxidase (ChO) enzyme was immobilized at platinum (Pt) wire plated with membrane materials of SA 5%, 10%, 15% and GA 25%. Result of this research show that for cellulose acetate (SA) 5% the detection limit is  $10^{-7.7}$  M, for SA 10% the detection limit is  $10^{-8.7}$  M, for SA 15% the detection limit is  $10^{-7.6}$  M. This a results is approximately equal to 2,2 ppb. ), which means that this biosensor is very sensitive for determining carbamates pesticides residue where its detection limit is comparable to to the detection limit of conventional instrument such as Gas Chromatography (GC) and High Pressure Liquid Chromatography (HPLC), i.e. respectively 1,5 ppb and 2,0 ppb.

Keywords : Biosensors, immobilized, enzyme Acetylcholinesterase (AChE) and choline oxidase (ChO), carbamate pesticides

Received : 23 August 2011

Accepted : 4 October 2011

### Abstrak

Keberadaan pestisida karbamat pada lingkungan dan bahan pangan berpotensi membahayakan kesehatan manusia. Oleh karena itu perlu di desain biosensor untuk mengontrol keberadaan pestisida pada lingkungan dan bahan pangandengan cepat. Tujuan penelitian ini adalah mendesain biosensor elektrokimia untuk analisis residu pestisida karbamat pada bahan pangan. Desain biosensor menggunakan enzima setilkolinesterase (AChE) dan kolinoksidase (ChO) yang diimmobilisasikan pada kawat platina (Pt) yang dilapisi dengan bahan membranselulosaasetat (SA) 5%, 10%, 15% dan glutaraldehid (GA) 25%.

\*Penulis Korespondensi/corresponding author: Telp.+62 401 3191929 Fax. +62 401 3190496

E-mail: mashuni@yahoo.co.id

Hasil penelitian menunjukkan limit deteksi untuk SA 5% adalah  $10^{-7,7}$  M, untuk SA 10% adalah  $10^{-8,7}$  M dan untuk SA 15% adalah  $10^{-7,6}$  M. Hasil ini setara dengan 2,2 ppb sama dengan limit deteksi GC dan HPLC (2,0 ppb dan 1,5 ppb) sehingga biosensor ini sensitive untuk analisis residu pestisida karbamat.

Kata kunci : Biosensor, immobilisasi, enzim asetilkolinesterase (AChE) dan kolinoksidase (ChO), pestisidakarbamat

Diterima: 23 Agustus 2011

Disetujui untuk dipublikasikan: 4 Oktober 2011

## 1. Pendahuluan

Di antara semua senyawa kimia yang berbahaya di lingkungan, pestisida merupakan yang paling besar jumlahnya terutama dalam tanah, air, atmosfer dan produk pertanian. Keberadaannya begitu meluas di lingkungan sehingga dapat menimbulkan masalah bagi kesehatan manusia. Salah satu usaha yang dapat dilakukan untuk memperbaiki ketahanan pangan bagi masyarakat yaitu menyediakan bahan pangan selain bergizi juga harus aman untuk dikonsumsi. Keamanan pangan dari residu pestisida dapat dikontrol dengan cepat dan akurat dengan mendisain suatu biosensor pestisida.

Beberapa pestisida sangat toksik, dan akumulasi pestisida dalam organisme hidup dapat menyebabkan penyakit yang serius. Jika keberadaan pestisida dalam jumlah yang rendah tapi stabil, dapat menimbulkan toksisitas yang akut sehingga diperlukan

sistem deteksi yang cepat untuk melindungi kesehatan manusia serta sebagai kontrol bagi produk makanan dan polusi lingkungan [1].

Dalam beberapa dekade terakhir pemakaian pestisida didominasi oleh dua jenis insektisida yaitu senyawa karbamat dan organofosfat. Kedua senyawa tersebut banyak diaplikasikan pada pengolahan pertanian karena kestabilannya yang rendah di lingkungan dibandingkan dengan senyawa organoklorin [2,3]. Efisiensi karbamat dan organofosfat sebagai pestisida dan toksisitasnya terhadap manusia dan hewan disebabkan oleh kemampuan menghambat kelompok enzim hidrolase yang disebut esterase. Enzim asetilkolinesterase (AChE) sangat penting untuk sistem saraf pusat pada manusia dan serangga [4].

Enzim asetilkolinesterase menghidrolisis asetilkolin pada membran

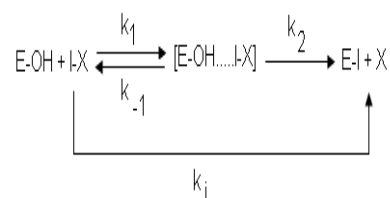
untuk mencegah akumulasi. Penghambatan AChE menyebabkan akumulasi asetilkolin sehingga terjadi disfungsi beberapa sistem saraf dan perilaku dan dapat memicu kerusakan pada sistem pernafasan serta akhirnya dapat menyebabkan kematian [5,6].

Beberapa organisasi internasional mengatur batas maksimum residu pestisida pada konsumsi air minum dan pangan bagi manusia dan hewan. Beberapa diantaranya adalah *the Food and Agricultural Organisation (FAO)*, *the World Health Organisation (WHO)*, *the European Community (EU)*. Salah satu kebijakan yang dikeluarkan adalah memonitor batas satu jenis pestisida yang diperbolehkan pada suatu produk adalah 0,1 µg/L dan konsentrasi total pestisida tidak boleh melebihi 0,5 µg/L [4].

Analisis pestisida yang sudah sering dilakukan adalah dengan kromatografi gas (GC) atau kromatografi cair tekanan tinggi (HPLC). Kelemahan metode analisis ini karena membutuhkan perlakuan ekstraksi dan pemurnian di laboratorium yang membutuhkan waktu analisis yang lebih lama dan memungkinkan terdapatnya resiko kesalahan. Untuk mengatasi kekurangan tersebut sekarang ini sedang dikembangkan analisis pestisida dengan biosensor.

Keunggulan dari analisis pestisida dengan biosensor adalah respon yang cepat, selektif, sederhana dan biayanya yang relatif murah [7,8].

Pestisida karbamat merupakan inhibitor kolinesterase utama. Senyawa karbamat mempunyai beberapa struktur yang hampir sama dengan asetilkolin (ACh), substrat alami dari kolinesterase. Mekanisme inhibisi enzim berlangsung dalam dua tahap: pembentukan secara reversibel kompleks enzim inhibitor ( $K_d = k_{-1}/k_1$ ) dan ( $k_2$ ) yang menghasilkan enzim yang tidak aktif. Mekanisme total dikarakterisasi oleh konstanta laju inhibisi  $k_i = k_2/K_d$ , dapat dilihat pada persamaan sebagai berikut:



dimana E-OH enzim aktif, I-X inhibitor, E-I enzim yang tidak aktif, X gugus yang dapat dihidrolisis oleh inhibitor. Asetilkolinesterase (AChE) menghidrolisis *neurotransmitter* ACh dalam membran sinaptik, mempunyai peranan penting dalam kerja saraf pada manusia dan serangga. AChE menggunakan ACh sebagai substrat,

menghasilkan produk kolin (Ch) dan asam karboksilat.



Karena Ch tidak aktif secara elektrokimia, pengujian inhibisi didasarkan pada pengukuran perubahan pH yang terjadi pada pembentukan asam. Perubahan pH ini dapat dideteksi dengan indikator spektrofotometri pH-sensitif, indikator fluoresensi pH-sensitif atau secara potensiometri.

Pengembangan biosensor yang lebih sensitif dapat dilakukan dengan menggunakan sistem sensor bienzimatik untuk mendeteksi pestisida. Enzim yang dapat digabungkan secara bersama untuk mendeteksi pestisida adalah asetilkolinesterase (AChE) dan kolin oksidase (ChO).

Biosensor memiliki sensitivitas dan selektivitas yang tinggi, kecepatan respon, biaya yang rendah serta pengoperasiannya yang mudah, maka biosensor menjadi suatu peralatan penting untuk mendeteksi komponen kimia dan biologi pada obat-obatan, makanan dan monitoring lingkungan [9,10,11,12]. Tujuan yang ingin dicapai dalam penelitian ini adalah menghasilkan biosensor karbamat yang sensitif untuk menganalisis kandungan residu pestisida

yang terdapat pada bahan pangan terutama residu yang terkandung pada sayur-sayuran. Dalam penelitian ini akan didisain biosensor karbamat menggunakan membran enzim Asetilkolinesterase (AChE) dan kolin oksidase (ChO) dengan bahan pendukung Selulosa Asetat (SA) dan Glutaraldehyd (GA) dalam bentuk elektroda kawat terlapis. Selulosa asetat memiliki kestabilan yang baik terhadap berbagai macam zat kimia, mempunyai kekuatan mekanik yang baik dan tahan terhadap tekanan tinggi sehingga dapat menahan materi yang sangat kecil. Penggunaan glutaraldehyd dilakukan karena sifatnya sebagai ikatan pembawa berfungsi sebagai pereaksi bifungsional antara enzim dan selulosa asetat. Penggunaan komposisi membran dan konstruksi elektroda tersebut untuk deteksi karbamat belum pernah dipublikasikan.

## 2. Bahan dan Metode

### 2.1 Bahan

Bahan yang digunakan adalah kawat perak, KCl, kawat tembaga, kawat platina, kawat timah, enzim asetilkolinesterase (AChE), enzim kolin oksidase (ChO<sub>x</sub>), Selulosa Asetat (SA), Glutaraldehyd (GA), asetilkolin klorida, pestisida karbamat (karbofuran), NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O, selanjutnya

diencerkan dengan aquades hingga tanda batas.

## **2.2 Pembuatan larutan enzim AChE dan ChOx**

Enzim AChE dari *Electrophorus electricus* Sigma 1,17 mg dengan aktivitas 425,94 unit per mg padatan dilarutkan dalam pelarut 9,0 ml buffer fosfat pH 8,0 dan 1 ml KCl 0,1 M. Enzim ChO<sub>x</sub> dari *Alcaligenes sp lyophilized* Sigma sebanyak 3,3 mg dengan aktivitas 15 unit per mg padatan dilarutkan dalam pelarut 9,0 ml buffer fosfat pH 8,0 dan 1 ml KCl 0,1 M.

## **2.3 Pembuatan selulosa asetat 5%, 10%, 15% dan glutaraldehyd 25%**

Selulosa Asetat (SA) 5%, 10% dan 15% dibuat dengan menimbang masing-masing 0,5 gram, 1,0 gram dan 1,5 gram SA. Selanjutnya masing-masing SA dilarutkan dengan aseton 10 ml. Larutan Glutaraldehyd (GA) 25% yang digunakan pada penelitian ini adalah produksi Aldrich Sigma.

## **2.4 Pembuatan membran Biosensor**

Membran dibuat dari enzim asetilkolinesterase (AChE) dan kolin oksidase (ChO<sub>x</sub>) yang diimmobilisasikan pada bahan pendukung selulosa asetat (SA) dan glutaraldehyd (GA) dengan komposisi

seperti pada Tabel 1. Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.12H<sub>2</sub>O, aseton, etanol, aquades, parafilm.

## **2.5 Peralatan**

Alat yang digunakan adalah pH meter Orion Model 710A/potensiometer, pengaduk magnetik, oven, neraca analitik, stopwatch, solder, lemari pendingin, tip biru, peralatan gelas yang biasa digunakan di laboratorium.

## **2.6 Pembuatan larutan standar**

Penyiapan larutan NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>. H<sub>2</sub>O 0,2 M (larutan A) dan larutan Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>. 12H<sub>2</sub>O 0,2 M (larutan B). Selanjutnya dari larutan A dan larutan B dibuat masing-masing larutan buffer fosfat pH 8,0. Larutan standar substrat asetilkolin klorida dibuat dalam pelarut buffer fosfat pH 8,0 pada konsentrasi  $1 \times 10^{-3}$  M -  $1 \times 10^{-9}$  M. Selanjutnya larutan standar pestisida karbofuran  $1 \times 10^{-1}$  M disiapkan dengan menimbang secara teliti karbofuran kemudian dilarutkan dengan etanol dalam labu ukur 100 ml diencerkan sampai tanda batas. Terhadap larutan ini kemudian dilakukan pengenceran sampai konsentrasi  $1 \times 10^{-2}$  M -  $1 \times 10^{-9}$  M. Penyiapan larutan KCl 0,1 M, dilakukan dengan melarutkan 0,7445 gram KCl ke dalam aquades pada labu ukur 100 ml selanjutnya diencerkan dengan aquades hingga tanda batas.

## 2.7 Pembuatan larutan enzim AChE dan ChO<sub>x</sub>

Enzim AChE dari *Electrophorus electricus* Sigma 1,17 mg dengan aktivitas 425,94 unit per mg padatan dilarutkan dalam pelarut 9,0 ml buffer fosfat pH 8,0 dan 1 ml KCl 0,1 M. Enzim ChO<sub>x</sub> dari *Alcaligenes sp lyophilized* Sigma sebanyak 3,3 mg dengan aktivitas 15 unit per mg padatan dilarutkan dalam pelarut 9,0 ml buffer fosfat pH 8,0 dan 1 ml KCl 0,1 M.

## 2.8 Pembuatan selulosa asetat 5%, 10%, 15% dan glutaraldehid 25%

Selulosa Asetat (SA) 5%, 10% dan 15% dibuat dengan menimbang masing-masing 0,5 gram, 1,0 gram dan 1,5 gram SA. Selanjutnya masing-masing SA dilarutkan dengan aseton 10 ml. Larutan Glutaraldehid (GA) 25% yang digunakan pada penelitian ini adalah produksi Aldrich Sigma.

## 2.9 Pembuatan membran Biosensor

Membran dibuat dari enzim asetilkolinesterase (AChE) dan kolin oksidase (ChO<sub>x</sub>) yang diimmobilisasikan pada bahan pendukung selulosa asetat (SA) dan glutaraldehid (GA) dengan komposisi seperti pada Tabel 1.

Tabel 1: Komposisi biosensor pestisida karbamat

Komposisi membran			
(SA)	(GA)	AChE (IU/ml)	ChO (IU/ml)
5%	25 %	49,8303	4,95
10%			
15%			

## 2.10 Desain elektroda biosensor

Badan elektroda dibuat dari kawat tembaga panjang 7 cm dengan diameter 1 cm disambungkan dengan kawat platina (Pt) panjang 2,0 cm berdiameter 0,4 mm kemudian dipatri menggunakan kawat timah. Selanjutnya dimasukkan ke dalam tip biru dengan posisi kawat platina (Pt) menonjol keluar 1,5 cm digunakan sebagai badan elektroda. Pada masing-masing badan elektroda dililitkan plastik parafilm sebagai perekat kawat Cu dan kawat Pt. Bagian ujung elektroda yaitu kawat Pt dicelupkan dalam larutan homogen selulosa asetat. Setelah lapisan selulosa asetat terbentuk, elektroda dibilas dengan aquades sebanyak tiga kali. Selanjutnya pada bagian kawat Pt yang telah dilapisi membran selulosa asetat dicelupkan dalam larutan glutaraldehid selama enam jam setelah itu elektroda dibilas buffer fosfat pH 8,0 maka terbentuk elektroda membran (Em), selanjutnya Em dicelupkan dalam buffer fosfat pH 8,0 yang mengandung enzim asetilkolinesterase dan enzim kolin oksidase selama 48 jam. Elektroda membran (Em) yang belum

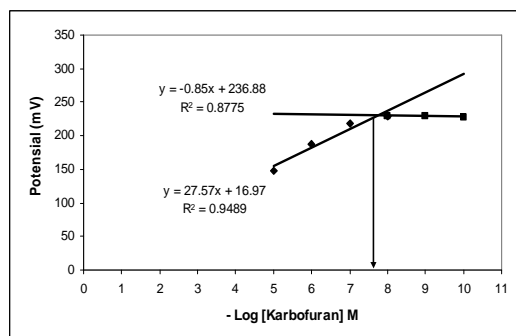
digunakan tetap dicelupkan ke dalam buffer fosfat pH 8,0 pada temperatur 4 °C.

### 2.11 Pengukuran Batas Deteksi Biosensor Pestisida Karbamat

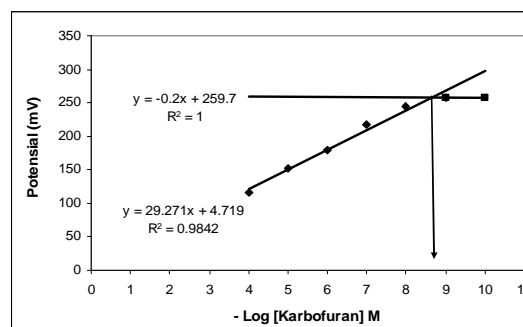
Pengukuran potensial substrat Asetilkolin klorida dengan inhibitor pestisida karbofuran dengan cara elektroda biosensor yang telah dibuat sebelum dipakai terlebih dahulu dicelupkan dalam larutan buffer fosfat pH 8,0 kemudian elektroda biosensor digunakan untuk mengukur potensial substrat asetilkolin klorida dengan konsentrasi  $10^{-3}$  M yang telah ditambahkan larutan karbofuran dengan konsentrasi bervariasi dari  $10^{-3}$  –  $10^{-9}$  M.

## 3. Hasil dan Pembahasan

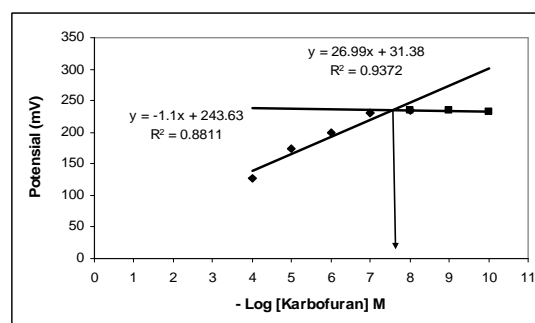
### 3.1. Hasil Pengamatan



Gambar 1. Limit deteksi biosensor untuk Komposisi membran SA 5% GA 25%



Gambar 2. Limit deteksi biosensor untuk komposisi membran SA 10%, GA 25%



Gambar 3. Limit deteksi biosensor untuk komposisi membran SA 15%, GA 25%

### 3.2. Pembahasan

Immobilisasi enzim AChE dan ChO pada bahan pendukung selulosa asetat dan glutaraldehid dapat dilakukan dalam pembuatan membran biosensor pestisida karbamat. Membran selulosa asetat memiliki kestabilan yang baik terhadap berbagai macam zat kimia, mempunyai kekuatan mekanik yang baik sehingga tahan terhadap tekanan tinggi dan selektif sehingga dapat menahan materi yang sangat kecil. Biosensor yang didasarkan pada prinsip inhibisi enzim dapat digunakan secara luas

untuk mendeteksi suatu analit seperti komponen pestisida dan logam berat. Pemilihan sistem enzim/analit didasarkan pada kenyataan bahwa analit toksik ini menghambat fungsi normal enzim. Pada umumnya, pengembangan sistem biosensing ini mengandalkan pengukuran kuantitatif pada aktivitas enzim sebelum dan sesudah direaksikan atau dikontakkan dengan suatu analit target.

Metode analisis yang spesifik bagi penentuan kuantitatif suatu unsur atau molekul dalam jumlah renik pada suatu sampel selalu dihadapkan pada limit deteksi yang dinyatakan dengan suatu konsentrasi terendah dari suatu zat yang dapat ditentukan. Penentuan limit deteksi suatu elektroda dapat dilakukan dengan membuat garis singgung pada fungsi linier yang Nernstian dan non Nernstian. Titik potong kedua garis diekstrapolasikan ke sumbu x sehingga dapat diperoleh konsentrasi limit deteksi. Hasil penentuan limit deteksi elektroda biosensor yang telah didisain dapat dilihat pada Gambar 1 sampai gambar 3.

Dari hasil ekstrapolasi terhadap sumbu x yaitu  $-\log$  [karbofuran] diperoleh limit deteksi biosensor dengan komposisi membran SA 5%, GA 25% adalah  $10^{-7.7}$  M

( $\approx 0,00221$  ppm atau 2,2 ppb. Limit deteksi biosensor dengan komposisi membran SA 10%, GA 25% adalah  $10^{-8.7}$  M ( $\approx 0,000221$  ppm atau 0,2 ppb). Biosensor dengan komposisi membrane ini yang terbaik dari biosensor lainnya. Pada Gambar 1 – 3 hasil ekstrapolasi terhadap sumbu x yaitu  $-\log$  [karbofuran] M diperoleh limit deteksi biosensor  $10^{-7.6} - 10^{-8.7}$  M ( $\approx 0,0221 - 0,00221$  ppm). Adanya perbedaan limit deteksi yang diperoleh disebabkan perbedaan komposisi membrane dari elektroda biosensor. Limit deteksi terkecil diperoleh pada membran SA 15% hal ini disebabkan karena zat pendukung membran SA dengan konsentrasinya lebih tinggi menyebabkan bahan pendukung lebih tebal sehingga GA yang berfungsi sebagai bahan pengikat enzim sulit menembus pori-pori material SA.

#### 4. Kesimpulan

Hasil penelitian menunjukkan bahwa untuk komposisi membran SA 5% dan GA 25% diperoleh limit deteksi  $10^{-7.7}$  M, untuk SA 10% dan GA 25% diperoleh limit deteksi  $10^{-8.7}$  M, untuk SA 15% dan GA 25% diperoleh limit deteksi  $10^{-7.6}$  M. Hasil tersebut sebanding dengan 0,0022 ppm atau 2,2 ppb). Limit deteksi biosensor karbamat berkisar antara  $10^{-7} - 10^{-9}$  M. Limit deteksi maksimum diperoleh pada komposisi



membran selulosa asetat (SA) 10% danglutaraldehyd (GA) 25%. Sebagaimana alat ukur instrumen lain seperti GC dan HPLC yang mempunyai limit deteksi karbamat sebesar 2 ppb, maka biosensor hasil desain dapat diaplikasikan untuk mendeteksi pestisida karbamat dengan lebih efisien karena dapat dibawa ke lapangan.

## 5. Pustaka

1. Ciucu, A.A., Negulescu, C., and Baldwin, R.P., 2003, Detection of Pesticides Using an Amperometric Biosensors Based on Ferrophthalocyanine Chemically Modified Carbon Paste Elekcrode and Immobilized Bienzymatic System, *Biosensors and Bioelctronics*, 18, 303 – 310.
2. Pogacnik, L., and Franko, M., 2003, Detection of Organophosphate and Carbamate Pesticides in Vegetable Samples by a Photothermal Biosensor, *Biosnsors and Bioelektronics*, 18, 109.
3. Skadal, P., Nunes, G.S., Yamanaka, H., and Ribeno, M.L., 1997, Detection of Carbamate Pesticides in Vegetable Samples Using Cholinesterse-based Biosensors, *Electroanalysis*, 9, 1083-1087.
4. Prieto-Simon, B., Campas, M., Andreescu, S., and Marty, J., 2006, Trends in Flow-based Biosensing Syatems for Pesticide Assessment, *Sensors*, 6, 1161 – 1186.
5. Donarski, W.J., Dumas, D.P., Heitmeyer, D.P., Lewis, V.E., and Raushel, F.M., 1989, Structure-activity Relationship in The Hydrolysis of Substrates by The Phosphotriesterase from Pseudomonas diminuta, *Biochemistry*, 28, 4650-4655.
6. Tuovinen, K., Kaliste-Korhonen, E., Raushel, F.M., and Hanninen, O., 1994, Phosphotriesterase-A Promising Candidate for Use in detoxification of Organophosphates, *Fundam. Appl. Toxicol.*, 23, 578-584.
7. Mehrvar, M. and Abdi, M., 2004, Recent Developments, Charachteristics and Potential Applications of Electrochemical Biosensors, *Analytical Science*, 20, 1113 – 1126.
8. Velasco-Garcia, M.N. and Mottram, T., 2003, Biosensors Technology Addressing Agricultural Problems, *Automation and Emerging Technologies*, 84 (1), 1 – 12.
9. Amine, A., Mohammadi, H., Bourais, I. and Palleschi, G., 2006,

EnzymeInhibition-Based Biosensors for Food Safety and Environmental Monitoring, *Biosensors and Bioelectronics*, 21, 1405 – 1423.

10. Baeumner, A., 2004, Biosensor for Environmental Poltatanants and Food Contaminants, *Anal Bioanal Chem*, 377, 434 – 445.
11. Renedo, O.D., Alonso-Limillo, M.A. and Martinez, M.J., 2007, Recent Developments in the Field of Screen-Printed Electrodes and their Related Applications, *Talanta*. 73, 202 – 219.
12. Tudorache, M., and Bala, C., 2007, Biosensors Based on Screen-Printing Technology, and their Applications in Environmental and Food Analysis, *Anal BioanalChem*, 388 , 565 – 578.