

OPTIMASI PEMBUATAN BIOSENSOR DIAZINON MENGGUNAKAN ENZIM ALKALIN FOSFATASE DI PERMUKAAN SPCE–KITOSAN

Nuzulul Kurniawan Isvani, Ani Mulyasuryani*, Anna Roosdiana

*Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Brawijaya
Jl. Veteran Malang 65145*

*Alamat korespondensi, Tel : +62-341-575838, Fax : +62-341-575835
Email: mulyasuryani@ub.ac.id

ABSTRAK

Kinerja biosensor didasarkan pada reaksi hidrolisis diazinon menjadi O,O dietil fosforotioat, 2-isopropil-6-metil pirimidin-4-ol dan ion H^+ yang dikatalisis oleh alkaline fosfatase (ALP). Kinerja biosensor dipengaruhi oleh ALP yang teramobil, luas permukaan elektroda dan metode amobilisasi enzim. Pada penelitian ini alkaline fosfatase diamobilkan pada membran kitosan-glutaraldehid di permukaan SPCE. Pengukuran diazinon dilakukan pada pH larutan 8,5 dengan ALP sebanyak 0,325; 0,650; 0,975; 1,30; 1,65 μg yang diamobilkan secara adsorpsi. Luas SPCE dipelajari pada 5 mm \times 1,5 mm dan 7 mm \times 1,5 mm. Tahap akhir adalah karakterisasi biosensor menggunakan metode amobilisasi adsorpsi dan ikatan silang. Hasil penelitian menunjukkan kinerja optimum diperoleh pada massa ALP amobil 1,65 μg secara ikatan silang, luas SPCE 5 mm \times 1,5 mm, dengan kisaran konsentrasi (0,27 - 1,5) ppm, kepekaan 32,61 mV/ppm, dan batas deteksi 0,27 ppm.

Kata kunci: alkaline fosfatase, biosensor, diazinon, glutaraldehid, kitosan, spce (*screen printed carbon electrode*)

ABSTRACT

The performance of biosensor is based on hydrolysis reaction of diazinon into O,O diethyl phosphorothioic, 2-isopropyl-6-methylpyrimidin-4-ol, and H^+ catalyzed by alkaline phosphatase (ALP). Biosensor's performances are affected by immobilized ALP, surface area of the electrode and method of enzyme immobilization. In this research, alkaline phosphatase was immobilized on chitosan-glutaraldehyde membrane on the surface of SPCE. Diazinon measurements were carried out at pH 8.5, using 0.325; 0.650; 0.975; 1.30; 1.65 μg alkaline phosphatase which was immobilized by adsorption. Surface area of SPCE studied at 5 mm \times 1,5 mm and 7 mm \times 1,5 mm. The last step was characterization of biosensors by using enzyme immobilization both adsorption and crosslinking. The results showed that optimum performance is obtained at 1.65 μg ALP immobilized by crosslink, 5 mm \times 1,5 mm SPCE, with a range of concentrations (0.27 to 1.5) ppm, 32.61 mV/ppm sensitivity, and 0.27 ppm of LOD.

Keywords: alkaline phosphatase, biosensor, chitosan, diazinon, glutaraldehyde, spce (*screen printed carbon electrode*)

PENDAHULUAN

Diazinon merupakan salah satu pestisida organofosfat yang paling banyak digunakan untuk pengendalian hama pertanian [1]. Penggunaan yang terus meningkat dan berlebihan mengakibatkan akumulasi diazinon pada hasil pertanian yang melebihi batas maksimal [2]. Ambang batas kadar diazinon pada sayuran adalah 0,5 mg/kg dan pada beras 0,1 mg/kg [3]. Metode analisa diazinon diperlukan untuk menjamin keamanan hasil pertanian. Metode standar untuk analisa organofosfat adalah kromatografi gas (KG) dan kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT) dengan detektor spektrometer massa [4]. Batas deteksi metode tersebut

berkisar antara 0,0017 – 0,2667 mg/kg, namun metode tersebut tidak bisa digunakan langsung di lapang. Perangkat analitik tersebut memiliki dimensi yang besar, membutuhkan sumber energi yang besar dan harus stabil, selain itu kolom kromatografi dan detektor spektrometer massa membutuhkan kondisi pengoperasian yang khusus [5]. Oleh karena itu pada penelitian ini dikembangkan biosensor sebagai salah satu metode alternatif yang lebih ringkas, cepat dan akurat, yang diharapkan bisa digunakan langsung di lapang.

Pada penelitian ini dilakukan pembuatan biosensor diazinon berbasis enzim alkalin fosfatase dengan SPCE–kitosan sebagai elektroda. Penentuan kadar diazinon didasarkan pada reaksi hidrolisis diazinon menjadi O,O dietil fosforotioat dan 2-isopropil-6-metil pirimidin-4-ol serta ion H^+ [6] yang dikatalisis oleh alkalin fosfatase. Hasil reaksi tersebut akan menyebabkan perubahan konduktivitas di permukaan elektroda yang dapat dijadikan dasar respon. SPCE (*screen printed carbon electrode*) digunakan sebagai elektroda karena telah berhasil digunakan untuk analisis secara *in-situ* beberapa senyawa pestisida [7]. Kitosan memiliki biokompatibilitas yang baik sehingga amobilisasi enzim alkalin fosfatase pada kitosan tidak menghilangkan aktifitas enzim [8]. Variabel yang dipelajari dalam penelitian ini meliputi pengaruh massa enzim alkalin fosfatase amobil, luas permukaan elektroda dan metode amobilisasi terhadap kinerja biosensor. Tujuannya adalah untuk mengetahui massa enzim alkalin fosfatase, luas permukaan dan metode amobilisasi yang memberikan kinerja optimum pada biosensor.

METODA PENELITIAN

Bahan dan Alat

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah alkalin fosfatase 13 mg/mL (3813 unit/mg protein), diazinon 600 g/L, padatan kitosan, glutaraldehid 25% (v/v), padatan tris(hidroksimetil) aminometan, larutan HCl pekat 37% (b/b) 1,18 g/mL, akuades steril, asam asetat glasial 1,05 g/mL, dan akuades.

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah peralatan gelas umum, pH meter (school-gerate tipe CG 820), neraca (ohous), digital multimeter termodifikasi (sanwa CD 800), oven (Mempert), magnetik stirer (Cimarec), spektrofotometer UV–Vis (Shimadzu 1601), pipet mikro (Accumax pro) dan elektroda SPCE (*screen printed carbon electrode*).

Prosedur Pembuatan Biosensor Diazinon

Biosensor yang dirancang menggunakan sel konduktometri dengan SPCE sebagai elektroda. SPCE dibatasi dengan selotip untuk menentukan luas area yang akan dilapisi membran. Luas permukaan elektroda yang digunakan adalah $5\text{ mm} \times 1,5\text{ mm}$. Elektroda yang telah diselotip dilapisi dengan kitosan 1% (b/v) kemudian glutaraldehid 0,1% (v/v) masing-masing sebanyak $10\ \mu\text{L}$, selanjutnya dikeringkan dalam oven dengan temperatur $50\ ^\circ\text{C}$ selama 30 menit. Alkalin fosfatase diamobilkan pada permukaan elektroda yang telah dilapisi membran. Larutan enzim dengan konsentrasi $65\ \mu\text{g/mL}$ dipipet sebanyak 5, 10, 15, 20, $25\ \mu\text{L}$, kemudian diamobilkan di permukaan elektroda yang terlapisi membran. Larutan uji diazinon pH 8,5 dengan dengan konsentrasi 0; 0,1; 0,3; 0,5; 0,7; 1,0; 1,5 ppm digunakan untuk pengukuran. Pengukuran dilakukan selama 45 detik dan dicatat setiap 10 detik. Pengukuran untuk masing-masing konsentrasi diazinon dilakukan pengulangan sebanyak 5 kali.

Pengaruh Luas Permukaan Elektroda dan Metode Amobilisasi

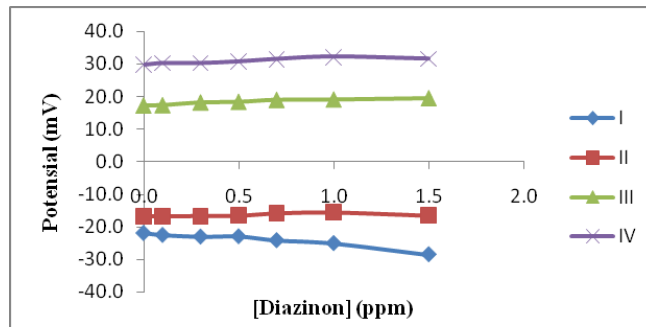
Permukaan elektroda yang dilapisi membran diperluas menjadi $7\text{ mm} \times 1,5\text{ mm}$, kemudian dilapisi enzim dengan massa optimum. Selanjutnya dilakukan pengukuran dengan 3 kali pengulangan. Penentuan pengaruh metode amobilisasi dilakukan dengan cara membandingkan kinerja metode amobilisasi ikatan silang dengan adsorpsi. Pada amobilisasi secara ikatan silang dilakukan dengan cara menambahkan larutan glutaraldehid 0,1% sebanyak $5\ \mu\text{L}$ setelah enzim ditambahkan, sedangkan pada metode adsorpsi tidak dilakukan penambahan larutan glutaraldehid 0,1%.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pengaruh Massa Enzim Alkalin Fosfatase terhadap Kinerja Biosensor

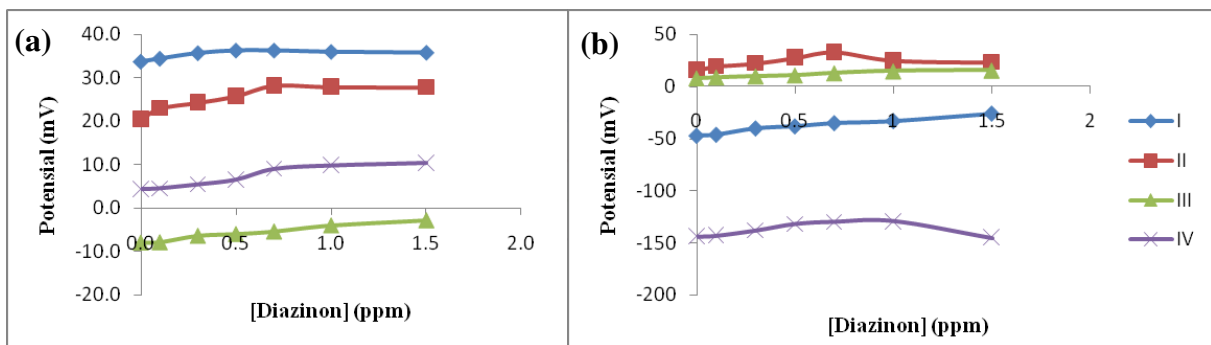
Pada penelitian ini dibuat 5 jenis elektroda yang masing-masing dilapisi enzim sebanyak $0,325\ \mu\text{g}$, $0,650\ \mu\text{g}$, $0,975\ \mu\text{g}$, $1,30\ \mu\text{g}$ dan $1,625\ \mu\text{g}$. Hasil pengukuran menggunakan biosensor dengan $0,325\ \mu\text{g}$ enzim disajikan pada Gambar 1.

Berdasarkan Gambar 1 dapat dilihat bahwa peningkatan konsentrasi diazinon tidak memberikan perubahan sinyal yang besar. Biosensor dengan $0,325\ \mu\text{g}$ enzim memiliki kepekaan sebesar $1,85\ \text{mV/ppm}$. Hal ini menunjukkan bahwa pada detik ke-45, biosensor dengan $0,325\ \mu\text{g}$ enzim menghasilkan produk hidrolisis yang masih terlalu sedikit untuk memberikan perubahan sinyal.



Gambar 1. Karakteristik biosensor dengan massa enzim 0,325 µg (5 µL)

Pada biosensor dengan massa enzim 0,650 µg dan 0,975 µg tampak bahwa peningkatan sinyal sudah mulai muncul, terutama pada kisaran konsentrasi diazinon (0 – 0,5) ppm.

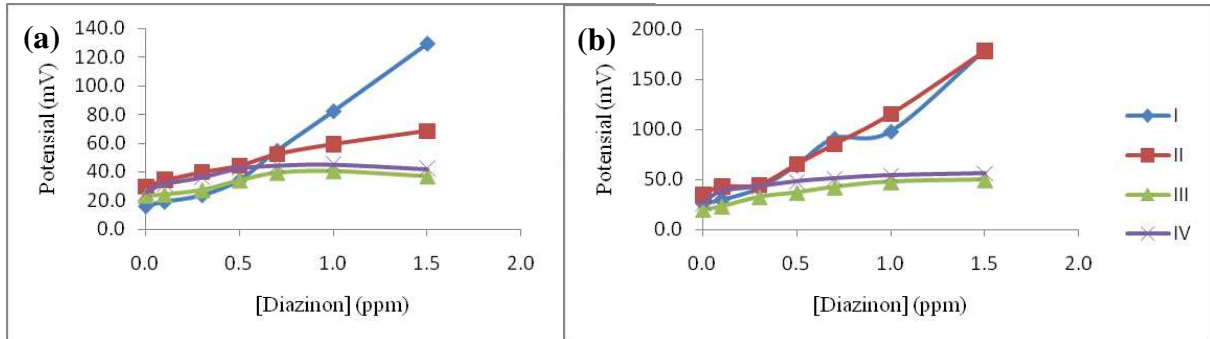


Gambar 2. (a) Karakteristik biosensor dengan massa enzim 0,650 µg (10 µL)
(b) Karakteristik biosensor dengan massa enzim 0,975 µg (15 µL)

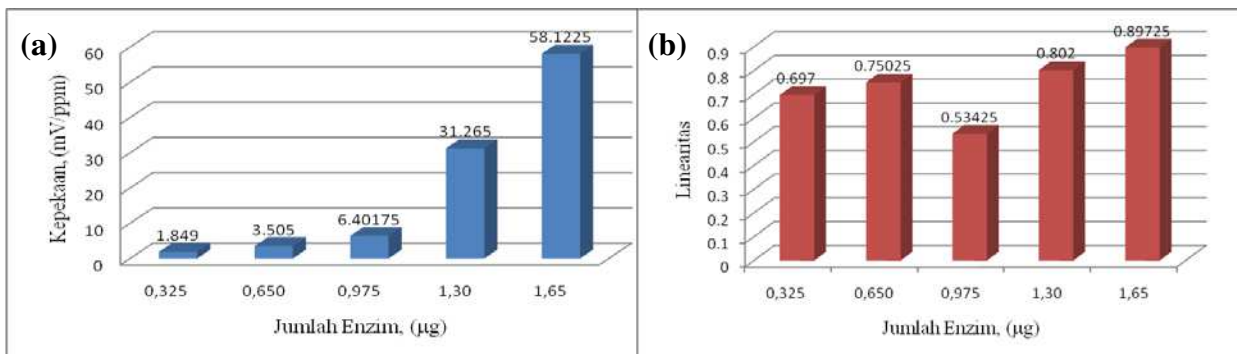
Berdasarkan Gambar 2, peningkatan sinyal terjadi pada rentang konsentrasi (0 – 0,5) ppm namun setelah pengukuran yang ke-5 (mulai konsentrasi 0,7–1,5) peningkatan sinyal sudah tidak terjadi. Hal ini dimungkinkan karena enzim telah terlepas dari permukaan elektroda.. Hasil ini menunjukkan bahwa biosensor dengan massa enzim 0,650 dan 0,975 µg mampu memberikan peningkatan sinyal yang lebih besar apabila dibandingkan dengan biosensor dengan jumlah enzim 0,325 µg, namun kepekaannya masih rendah. Biosensor dengan massa enzim 0,650 dan 0,975 µg memiliki kepekaan berturut-turut sebesar 3,51 mV/ppm dan 6,40 mV/ppm. Kepekaan yang relatif tinggi ditunjukkan pada biosensor dengan massa enzim 1,30 µg dan 1,65 µg, yang dapat dilihat pada Gambar 3 dan 4.

Kepekaan dan linearitas biosensor dengan massa enzim 0,325 – 1,65 µg disajikan pada Gambar 4. Hasil pengukuran menggunakan biosensor dengan massa enzim 1,30 µg dan 1,65 µg menunjukkan kepekaan yang tinggi dan linearitas yang baik apabila dibandingkan dengan biosensor dengan massa enzim (0,325 – 0,975) µg. Oleh karena itu, disimpulkan bahwa pada

kisaran (0 – 1,65) μg enzim, biosensor dengan 1,65 μg enzim memberikan kinerja yang optimum.



Gambar 3. (a) Karakteristik biosensor dengan massa enzim 1,30 μg (20 μL)
(b) Karakteristik biosensor dengan massa enzim 1,65 μg (25 μL)



Gambar 4. (a) Hubungan massa enzim amobil terhadap kepekaan
(b) Hubungan massa enzim amobil terhadap linearitas

Pengaruh Luas Permukaan Elektroda terhadap Kinerja Biosensor

Pada penentuan massa enzim alkaline fosfatase optimum digunakan elektroda SPCE dengan luas permukaan 5 mm \times 1,5 mm. Setelah massa enzim optimum telah diketahui tahap selanjutnya adalah penentuan pengaruh luas permukaan terhadap kinerja biosensor. Luas permukaan elektroda diperluas menjadi 7 mm \times 1,5 mm. Ukuran luas ini disesuaikan dengan dimensi wadah sampel dengan volume 300 μL dengan demikian luas 7 mm \times 1,5 mm merupakan luas maksimum elektroda yang mampu tercelup dalam wadah sampel. Selanjutnya dilakukan pengukuran dan diperoleh data seperti pada Tabel 1.

Berdasarkan Tabel 1, biosensor dengan luas permukaan elektroda 7 mm \times 1,5 mm memiliki kepekaan dan linearitas yang lebih kecil apabila dibandingkan dengan biosensor

dengan luas permukaan elektroda 5 mm × 1,5 mm. Oleh karena itu, pada tahap selanjutnya tetap digunakan elektroda dengan luas permukaan 5 mm × 1,5 mm.

Tabel 1: Pengaruh luas permukaan terhadap kinerja biosensor

Parameter	Biosensor dengan luas permukaan elektroda	
	5 mm × 1,5 mm	7 mm × 1,5 mm
Kisaran konsentrasi	(0 – 1,5) ppm	(0 – 1,5) ppm
Persamaan regresi	$y = 48,78x + 24,10$	$y = 17,25x + 30,32$
Kepekaan	48,78	17,25
Linearitas	0,993	0,981

Pengaruh Metode Amobilisasi terhadap Kinerja Biosensor

Pada tahap ini kinerja biosensor yang menggunakan metode amobilisasi enzim secara adsorpsi dibandingkan dengan metode ikatan silang, dan diperoleh hasil seperti pada Tabel 2.

Tabel 2: Pengaruh metode amobilisasi secara adsorpsi dan ikatan silang terhadap kepekaan dan linearitas biosensor

Parameter	Biosensor dengan luas permukaan elektroda	
	Adsorpsi	Ikatan silang
Persamaan regresi	$y = 25,01x + 16,27$	$y = 32,61x + 24,23$
Kepekaan	25,01x	32,61x
Linearitas	$R^2 = 0,988$	$R^2 = 0,976$

Berdasarkan Tabel 2, tampak bahwa metode ikatan silang mampu meningkatkan *life time* enzim di permukaan elektroda. Hal ini ditinjau dari nilai kepekaan metode ikatan silang yang tinggi. Peningkatan *life time* ini disebabkan oleh enzim yang teramobilisasi secara kimia di permukaan elektroda. Ikatan kimia terjadi antara atom C gugus aldehid pada glutaraldehid dengan atom N gugus amina yang terdapat pada enzim maupun kitosan melalui reaksi basa Schiff.

KESIMPULAN

Kinerja biosensor optimum diperoleh pada penggunaan enzim sebanyak 1,650 µg dengan metode amobilisasi secara ikatan silang, memiliki kisaran konsentrasi (0,27 – 1,5) ppm dengan kepekaan 32,61 mV/ppm dan batas deteksi 0,27 ppm.

DAFTAR PUSTAKA

1. Harper, B., Luukinen, B., Gervais, J.A., Buhl, K., dan Stone, D., 2009, *Diazinon Technical Fact Sheet*, National Pesticide Information Center: Oregon State University Extension Services
2. Gahlaut, A., Gothwal, A., Chhillar, A.K., dan Hooda, V., 2012, Electrochemical Biosensors for Determination of Organophosphorus Compounds: Review, *Open Journal of Applied Biosensor*, 1, pp. 1-8.
3. Menkes dan Mentan, 1996, *Keputusan Bersama Menteri Kesehatan dan Menteri Pertanian tentang Batas Maksimum Residu Pestisida pada Hasil Pertanian*, 881/MENKES/SKB/VIII/1996.
4. Mostafa, G.A.E., 2010, Electrochemical Biosensors for the Detection of Pesticides, *The Open Electrochemistry Journal*, 2, pp. 22-42.
5. Cserhádi, T. dan Szógyi, M., 2012, Chromatographic Determination of Pesticides in Foods and Food Products, *European Chemical Bulletin*, 1, 3, pp. 58-68.
6. Wyer, M., 2008, *Metal Ion Promoted Hydrolysis of The Organophosphorus Pesticide, Diazinon*, Thesis, Department of Chemistry of Queen's University Kingston, Ontario, Canada
7. Li, M., Li, Y.T., Li, D.W., dan Long, Y.T., 2012, Recent Developments and Applications of Screen-printed Electrodes in Environmental Assays—A review, *Analytica Chimica Acta*, 734, pp. 31– 44.
8. Hirano, S. dan Miura, O., 1979, Alkaline Phosphatase and Pepsin Immobilized in Gel, *Biotechnology and Bioengineering*, 21, pp. 711-714.