

**LAPORAN PENELITIAN
HIBAH BERSAING PERGURUAN TINGGI**



**RANCANG BANGUN BIOSENSOR ELEKTROKIMIA
SEBAGAI INSTRUMEN ANALISIS UNTUK KONTROL
KUALITAS MAKANAN DAN MINUMAN**

**Prof. Drs. Manihar Situmorang, M.Sc, Ph.D
Drs. P. Maulim Silitonga, M.Si
Dra. Isnaini Nurwahyuni, M.Sc**

**Dibiayai oleh Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi, Departemen Pendidikan Nasional,
sesuai dengan Surat Perjanjian Pelaksanaan Hibah Bersaing: Nomor:
003/SP2H/PP/DP2M/III/2008, Tanggal 6 Maret 2008**

**UNIVERSITAS NEGERI MEDAN
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM MEDAN
Nopember, 2008**

**HALAMAN PENGESAHAN LAPORAN AKHIR
HASIL PENELITIAN HIBAH BERSAING TAHUN 2008**

1. Judul Penelitian : Rancang Bangun Biosensor Elektrokimia Sebagai Instrumen Analisis Untuk Kontrol Kualitas Makanan dan Minuman
2. Ketua Peneliti:
- a. Nama lengkap dan Gelar : Prof. Drs. Manihar Situmorang, M.Sc, Ph.D
 - b. Jenis Kelamin : Laki-laki
 - c. NIP : 131 572 430
 - d. Jabatan Fungsional/Golongan : Guru Besar / IV/b
 - e. Jabatan Struktural : Dekan FMIPA
 - f. Bidang Keahlian : Kimia Analisis dan Elektroanalisis
 - g. Fakultas/Jurusan : FMIPA / Kimia
 - h. Perguruan Tinggi : Universitas Negeri Medan (Unimed)
 - i. Tim Peneliti :

Nama dan Gelar Akademik	Bidang Keahlian	Fakultas/ Jurusan	Perguruan Tinggi
1. Prof. Drs. Manihar Situmorang, M.Sc.Ph.D	Kimia Analisis	FMIPA Unimed	UNIMED
2. Drs. P. Maulim Silitonga, M.Si	Kimia Organik	FMIPA UNIMED	UNIMED
3. Dra. Isnaini Nurwahyuni, M.Sc	Fisiologi T'an	FMIPA USU	USU

3. Pendanaan dan Jangka Waktu Penelitian :
- a. Surat Perjanjian Kerja (SPK) : Nomor 140/H33.8/KEP/PL/2008 Tanggal 14 April 2008
 - b. Jangka waktu penelitian yang diusulkan : 3 (tiga) tahun
 - c. Biaya total yang diusulkan : Rp. 135.000.000,0 (Seratus tiga puluh lima juta rupiah)
 - d. Biaya yang disetujui tahun 2008 : Rp. 45.000.000,0 (Empat puluh lima juta rupiah)

Medan, 15 Nopember 2008

Ketua Peneliti,



(Handwritten Signature)
Prof. Drs. Manihar Situmorang, M.Sc, Ph.D
NIP. 131 572 430

Menyetujui:
Ketua Lembaga Penelitian Universitas Negeri Medan,
(Handwritten Signature)
Dr. Ridywan Abd. Sani, M.Si
NIP. 131 772 614



RINGKASAN

Rancang bangun biosensor elektrokimia sebagai instrumen analisis untuk kontrol kualitas makanan dan minuman dijelaskan dalam laporan hasil penelitian ini. Penelitian dilandasi oleh kebutuhan terhadap metode analisis untuk kontrol kualitas makanan dan minuman. Untuk kontrol kualitas makanan dan minuman diperlukan instrumen analisis yang akurat, sensitif, selektif, cepat, sederhana dan dengan biaya analisis relatif murah, yaitu menggunakan biosensor elektrokimia. Biosensor asam urat sangat menarik untuk dikembangkan karena memiliki selektifitas dan akurasi pendeteksian yang handal, serta mempunyai prospek ekonomi tinggi.

Penelitian yang dilakukan selama 3 tahun adalah pembuatan rancang bangun biosensor elektrokimia sebagai instrumen analisis untuk kontrol kualitas makanan dan minuman. Biosensor elektrokimia terdiri atas 3 bagian, yaitu (1) Biosensor elektrokimia dalam sistem Flow injeksi analisis menggunakan deteksi potensiometri untuk penentuan kolesterol dan asam urat, (2) Biosensor elektrokimia dalam sistem statik menggunakan deteksi amperometri untuk penentuan asam urat, dan (3) Strip biosensor untuk penentuan asam urat. Biosensor elektrokimia dalam sistem flow injeksi analisis dikembangkan melalui integrasi enzim dengan transduser telah menunjukkan hasil yang menggembirakan, yaitu memberikan respon terhadap analit dengan kondisi percobaan yang optimum adalah menggunakan redoks mediator 5 mM $K_4Fe(CN)_6$, carrier stream 10 mM buffer posfat pH 6.0, laju aliran carrier stream 1.5 mL/menit, volume injeksi sampel 50 μ L dapat digunakan untuk penentuan kolesterol di dalam berbagai jenis makanan dan minuman. Metode analisis sangat sensitif terhadap kolesterol, linearitas pengukuran lebar (0,005 – 5,0 mM kolesterol), slope 58,29 mV/perdekade konsentrasi kolesterol, dan batas deteksi 0,001 mM kolesterol. Biosensor telah diaplikasikan untuk penentuan kolesterol di dalam sampel daging segar (0,25-0,35 mM/g sampel), daging kaleng (0,50-0,60 mM/g sampel), dan minuman kaleng berlemak (0,58-0,80 mM).

Biosensor elektrokimia dalam sistem statik menggunakan deteksi amperometri untuk penentuan kadar asam urat dibuat dengan cara immobilisasi enzim urat oksidase atau urikase (UOx) pada matriks polityramin menggunakan *crosslinking agent* EDC/NHS untuk mendapatkan enzim elektroda yang memiliki aktivitas baik terhadap asam urat. Biosensor asam urat memberikan respon yang baik terhadap asam urat, yaitu arus yang terbentuk dalam sistem elektrokimia berasal dari hidrogen peroksida yang dihasilkan dari reaksi enzimasi meningkat setara dengan meningkatnya konsentrasi asam urat di dalam sampel, skala linearitas 0,1 – 2,5 mM, sensitivitas baik (slop 0,06 μ A/mM asam urat) dengan batas deteksi 0.05 mM asam urat., keterulangan tinggi (CV=0,02-0.09), stabil untuk penggunaan berulang-ulang dalam jangka waktu lama, bebas dari pengaruh senyawa pengganggu, akurasi penganalisisan baik dengan temuan 100-102%. Biosensor asam urat telah diaplikasikan untuk analisis kualitas makan dan minuman dalam berbagai jenis sampel seperti sayuran, buah-buahan, berbagai jenis makanan kaleng, berbagai jenis bagian daging, dan berbagai jenis ikan. Penentuan kadar asam urat di dalam sampel menggunakan biosensor dan standar spektrofotometri UV-Vis ($R^2=0,9354$).

Strip biosensor untuk penentuan kadar asam urat telah dikembangkan dengan cara immobilisasi enzim urat oksidase atau urikase (UOx) pada matriks polityramin menghasilkan instrumen analisis yang memberikan respon yang baik terhadap asam urat dengan linearitas pengukuran berada pada skala konsentrasi 0,1 – 4 mM, slop 0,044 μ A/mM asam urat. Strip Biosensor asam urat telah diaplikasikan untuk analisis kualitas makan dan minuman dalam berbagai jenis sampel dan hasil analisis asam urat di dalam sampel hampir sama dengan kadar asam urat menggunakan metode standar ($R^2=0,924$), dan temuan strip biosensor lebih baik dibanding metode standar spektrofotometri UV-VIS.

Dari hasil penelitian ini telah diperoleh langkah dan strategi yang tepat dalam membuat rancang bangun biosensor elektrokimia sebagai instrumen analisis untuk kontrol kualitas makanan dan minuman. Biosensor yang berhasil dilakukan dalam studi ini dapat dipergunakan sebagai strategi untuk membuat rancang bangun biosensor elektrokimia sebagai instrumen analisis untuk kontrol kualitas makanan dan minuman yang direncanakan dilanjutkan dalam penelitian berikutnya. Untuk memperoleh hasil yang optimum diharapkan perlu dilakukan penelitian lanjutan untuk meningkatkan batas deteksi agar dapat mendeteksi senyawa asam urat pada konsentrasi lebih rendah, dan membuat miniatur rancang bangun biosensor elektrokimia sebagai instrumen analisis khususnya studi intensip untuk membuat biosensor strip agar dapat digunakan sebagai metode standar untuk kontrol kualitas makanan dan minuman dan dapat diproduksi secara massal yang memiliki nilai ekonomi.



SUMMARY

The design of electrochemical biosensor as an analytical instrumentation for quality control of food and beverages is explained in the research reports. The study is based on the needed for an analytical method for quality control of food and beverages. A sensitive, selective, accurate, fast response, simple, easy to operate, and low cost instrumentations are needed to control the quality of foods and beverages, that were could be done by using of electrochemical biosensors. An Electrochemical biosensor is an analytical method that uses of enzyme as an active biological component that was integrated with electrochemical instrumentation for the determination of uric acid. This biosensor is very interesting to be developed as it having a high selective and accurate to target analyte as well as it has a potential for economic prospect.

The researches being conducted for three years were aimed to make a design of electrochemical biosensor as an analytical instrument for quality control of food and drinks. The study consisted of three parts; those are (1) Electrochemical biosensor in a flow injection analysis for the determination of cholesterol and uric acid, (2) Electrochemical biosensor in a static mode by using amperometric detection system for the determination of uric acid, and (3) Development of strip biosensor for uric acid. Electrochemical biosensor in a flow injection analysis was developed by integrating the enzyme with the transducer showed a good results, where it gives sensitive response to cholesterol and uric acid at an optimum condition of 5 mM $K_4Fe(CN)_6$ redox mediator, carrier stream of 10 mM phosphate buffer pH 6.0, flow rate of 1.5 mL/minute, injection volume of 50 μ L sample. The instrument is sensitive to cholesterol, where the linearity was lies between 0,005 – 5,0 mM cholesterol, slope 58,29 mV/per decade concentration of cholesterol, and the detection limit of 0.001 mM cholesterol. The biosensor has been applied for the determination of cholesterol in fresh meat (0,25-0,35 mM/g sample), canned meat (0,50-0,60 mM/g sample), and canned drink (0,58-0,80 mM).

Electrochemical biosensor in a static mode by using amperometric detector for the determination of uric acid was constructed by immobilization of uricase (UOx) in polytyramin matrixes by using EDC/NHS cross linking agent to obtain an enzyme electrode with high activity toward uric acid. The electrochemical biosensor developed in this study gave sensitive response to uric acid, where the electrochemical current obtained in an electrochemical cell was related to the formation of hydrogen peroxide in an enzymatic reaction, the detection linearity to uric acid lies between 0.1 – 2.5 mM, slope 0.06 μ A/mM and the limit detection was 0.05 mM uric acid, coefficient variation of CV=0.02-0.09, stable for prolong uses, free from normal interference, and the detection accuracy was 100-102%. The biosensor have been applied for uric acid determination in various food samples such as vegetables, beans and treated beans, canned food, fresh meat and fresh fish. It was found that the recovery with a biosensor was the same as a standard method ($R^2=0.9354$) in which the results obtained for uric acid determination was accepted.

Strip biosensor for uric acid has been developed by immobilization of uricase (UOx) in polytyramin matrixes to produce an analytical instrument with a sensitive response to uric acid, where the detection linearity lies between 0.1 – 4.0 mM, slope 0,044 μ A/mM uric acid. Strip biosensor for uric acid have been used to determine the concentration of uric acid in various food and beverages samples where the finding by using strip biosensor is similar to that obtained by the standard method for uric acid ($R^2=0,924$), and the recovery obtained by using strip biosensor were higher to that obtained by UV-Vis spectrophotometric method due to the accurate response of the method to uric acid.

Experimental results has demonstrated that the strategy and steps in the development techniques for making the design of electrochemical biosensor as an analytical instrumentation for quality control of food and beverages have been obtained. The biosensor obtained in this study could be used as a basic for the construction of electrochemical biosensor for quality controls for food and drinks intended to be conducted in the future study. Therefore, continuation of the study has to be done in the future to extend the detection sensitivity in order the biosensor could be used to analyze low concentration of uric acid in the samples. The construction of miniature biosensor has to be done to design strip biosensor in order to obtain a simple and small size biosensor simpler, and could be used as a standard instrument for quality control of food and beverages, and possibly could be fabricated as mass instruments with high potential economic value.



PRAKATA

Puji dan syukur penulis panjatkan kepada Tuhan Yang Maha Kuasa, atas segala berkatNya yang telah memberikan kesehatan dan hikmat kepada tim peneliti sehingga tahapan penelitian Hibah Bersaing Tahun 2006-2008 ini dapat terselesaikan dengan baik sesuai dengan waktu yang direncanakan, yaitu merupakan penelitian multi years yang sudah dikerjakan selama 3 tahun penelitian.

Kebutuhan terhadap metode analisis yang akurat, cepat, selektif, sederhana, mudah dioperasikan dan dengan biaya analisis yang relatif murah untuk kontrol kualitas makanan dan minuman sangat diperlukan. Metode analisis yang tepat akan dapat memberikan informasi yang akurat tentang komponen penyusun makanan dan minuman, khususnya senyawa-senyawa tertentu seperti kolesterol dan asam urat yang diindikasikan sebagai penyebab penyakit, sehingga memberikan manfaat yang besar pada produsen dan konsumen di dalam produksi dan pemilihan makanan dan minuman yang layak untuk dikonsumsi. Untuk memenuhi kriteria ini, maka instrumen analisis dengan menggunakan biosensor merupakan salah satu alternatif yang baik untuk dikembangkan. Penelitian dengan judul "Rancang Bangun Biosensor Elektrokimia Sebagai Instrumen Analisis Untuk Kontrol Kualitas Makanan dan Minuman" dilakukan sebagai penelitian Hibah Bersaing, yaitu pengembangan metode analisis untuk kontrol kualitas makanan dan minuman .

Dalam kesempatan ini penulis menyampaikan ucapan terima kasih kepada tim peneliti yang sudah bekerjasama dan bekerja keras dalam pelaksanaan penelitian ini, membantu dalam proses pelaksanaan penelitian sampai penyusunan laporan hasil penelitian. Ucapan terima kasih juga disampaikan kepada mahasiswa yang ikut ambil bagian di dalam penelitian ini. Ucapan terima kasih juga disampaikan kepada Pimpinan DP2M Dirjen Dikti Depdiknas yang sudah memberikan dana penelitian sehingga tahap penelitian seluruhnya dapat dilaksanakan. Ucapan terima kasih juga disampaikan kepada pimpinan Universitas Negeri Medan dan semua pihak yang sudah membantu tim peneliti dalam pelaksanaan penelitian ini. Penulis berharap agar hasil penelitian ini dapat digunakan sebagai informasi ilmiah tentang metode analisis menggunakan biosensor elektrokimia. Kiranya hasil penelitian ini bermanfaat bagi pengembangan ilmu pengetahuan dan teknologi serta merupakan informasi awal menuju kemungkinan keberhasilan di dalam pembuatan biosensor elektrokimia untuk analisis kuantitatif sebagai kontrol kualitas makana dan minuman.

Medan, 15 Nopember 2007
Ketua Peneliti,

Prof. Drs. Manihar Situmorang, M.Sc, Ph.D
NIP. 131 572 430

DAFTAR ISI

	Halaman
Halaman Pengesahan	i
Ringkasan	ii
Summary	iv
Kata Pengantar	vi
Daftar Isi	vii
Daftar Gambar	x
Daftar Tabel	xiv
Daftar Lampiran	xvi
BAB I PENDAHULUAN	1
1.1. Latarbelakang Masalah	1
1.2. Ruang Lingkup Penelitian	2
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	3
2.1. Analisis Untuk Kontrol Kualitas	3
2.2. Kolesterol	5
2.3. Asam Urat Dalam Makanan dan Minuman	6
2.4. Biosensor Sebagai Instrumen Analisis	8
2.5. Rumusan Masalah dan Batasan Masalah	11
BAB III TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN	13
3.1. Tujuan Penelitian	13
3.2. Manfaat Penelitian	14
BAB IV METODE PENELITIAN	15
4.1. Metode Penelitian Tahap I Dalam Sistem FIA	15
4.1.1. Zat kimia dan Larutan	15
4.1.2. Penyediaan Larutan	15
4.1.3. Penyediaan Sampel Penentuan Kolesterol Secara FIA	16
4.1.4. Penyediaan Sampel Penentuan Asam Urat Secara FIA	16
4.1.5. Peralatan Sistem FIA	16
4.1.6. Optimasi Sistem FIA	17
4.1.7. Kalibrasi Instrumen FIA	18
4.1.8. Selektifitas Biosensor Dalam Sistem FIA	18
4.1.9. Penentuan Kolesterol Secara FIA	18
4.1.10. Penentuan Asam Urat Secara FIA	18

4.1.11. Organisasi dan Analisis Data Metode FIA	19
4.2. Metode Penelitian Tahap II Dalam Sistem Statik	19
4.2.1. Rancangan Penelitian Tahap II Dalam Sistem Statik	19
4.2.2. Prosedur dan Tahapan Penelitian Metode Statik	20
4.2.2.1. Penyediaan Enzim Untuk Immobilisasi Enzim	20
4.2.2.2. Pembuatan Biosensor Elektrokimia Sistem Statik	20
4.2.2.3. Elektrodeposisi Platina Pada Elektroda Kerja	21
4.2.2.4. Pembuatan Matriks Polityramin Dan Immobilisasi Enzim Urikase	21
4.2.2.5. Integrasi Instrumentasi Sistem Statik	22
4.2.3. Optimasi Biosensor Asam Urat Dalam Sistem Statik	22
4.2.4. Praperlakuan Sampel Untuk Analisis Secara Biosensor	23
4.2.5. Analisis Sampel Secara Biosensor dan Spektrofotometri	24
4.3. Metode Penelitian Tahap III Menggunakan Strip Biosensor	26
4.3.1. Rancangan penelitian Tahap III Strip Biosensor	26
4.3.2. Prosedur dan Tahapan Penelitian Metode Strip	27
BAB V HASIL DAN PEMBAHASAN	29
5.1. Hasil Biosensor Elektrokimia Dalam Sistem FIA	29
5.1.1. Respon Biosensor Elektrokimia	29
5.1.2. Optimasi Sistem FIA	30
5.1.2.1. Pengaruh Konsentrasi Redoks Mediator $K_4Fe(CN)_6$	31
5.1.2.2. Respon FIA terhadap Analit	32
5.1.2.3. Pengaruh Volume injeksi	33
5.1.2.4. Pengaruh Laju Alir	33
5.1.3. Biosensor FIA Penentuan Kolesterol	35
5.1.3.1. Respon FIA Terhadap Kolesterol	35
5.1.3.2. Selektifitas Biosensor FIA Penentuan Kolesterol	37
5.1.3.3. Penentuan Kolesterol Dalam Makanan dan Minuman Secara FIA	38
5.1.4. Biosensor Penentuan Asam Urat Secara FIA	40
5.1.4.1. Respon Biosensor Terhadap Asam Urat	41
5.1.4.2. Waktu Inkubasi Enzim Urikase	42
5.1.4.3. Studi Keterulangan Instrumen FIA Penentuan Asam Urat	43
5.1.4.4. Penentuan Asam Urat Dalam Sampel	43
5.2. Hasil Biosensor Elektrokimia Penentuan Asam Urat Dalam Sistem Statik	44
5.2.1. Elektropolimerisasi Polityramin Sebagai Matriks Biosensor	45

5.2.2. Respon Biosensor Terhadap Asam Urat	47
5.2.3. Kondisi Optimum Biosensor Asam Urat	50
5.2.3.1. Pengaruh matriks polityramin	50
5.2.3.2. Pengaruh buffer terhadap sensitivitas biosensor	52
5.2.4. Keterulangan Biosensor Asam Urat	53
5.2.5. Stabilitas Biosensor Asam Urat	54
5.2.6. Selektifitas Biosensor Asam Urat	56
5.2.7. Uji Akurasi Biosensor Asam Urat	59
5.2.8. Analisis Asam Urat Dalam Makanan dan Minuman	61
5.2.8.1. Asam urat dalam sayuran dan buah-buahan	62
5.2.8.2. Asam urat dalam kacang-kacangan	63
5.2.8.3. Asam urat dalam makanan kaleng	64
5.2.8.4. Asam urat dalam daging segar	66
5.2.8.5. Asam urat dalam ikan segar	67
5.2.9. Kelebihan Biosensor Asam Urat	68
5.3. Hasil Biosensor Elektrokimia Menggunakan Strip Biosensor	69
5.3.1. Elektropolimerisasi Polityramin Pada Srip Biosensor	69
5.3.2. Respon Strip Biosensor Terhadap Asam Urat	72
5.3.3. Kondisi Optimum Srip Biosensor Asam Urat	74
5.3.3.1. Keterulangan Strip Biosensor Asam Urat	74
5.3.3.2. Stabilitas Strip Biosensor Asam Urat	74
5.3.4. Perlakuan sampel dan Analisis Sampel Makanan dan Minuman	76
5.3.4.1. Perlakuan Sampel Untuk Analisis Asam Urat	79
5.3.4.2. Analisis Asam Urat Dalam Makanan Berwujud Padat	81
5.3.4.3. Analisis Asam Urat Dalam Makanan Berwujud Padat	82
BAB VI KESIMPULAN DAN SARAN	85
6.1. Kesimpulan	85
6.2. Saran	87
DAFTAR PUSTAKA	88
LAMPIRAN	92

DAFTAR GAMBAR

Halaman

- Gambar 2.1. Jalur alternatif proses metabolisme pembentukan asam urat di dalam tubuh makhluk hidup 6
- Gambar 4.1. Disain rancang bangun biosensor elektrokimia dalam sistem flow injeksi analisis untuk penentuan kolesterol dan asam urat. 17
- Gambar 4.2. Rancang bangun biosensor elektrokimia dalam sistem statik yang terdiri atas: analit, komponen biologi, transduser terdiri atas komponen elektroda modifikasi, amplifikasi signal, dan signal prosessor pada mikrokomputer (Power Lab). 20
- Gambar 4.3. Disain biosensor dalam sistem statik yang terdiri atas: (1) analit, (2) komponen biologi, (3) transduser terdiri atas komponen elektroda modifikasi (1-3 semuanya dalam sel elektrokimia), (4) amplifikasi signal, dan (5) mikrokomputer. 22
- Gambar 4.4. Skema perlakuan sampel untuk analisis secara biosensor elektrokimia dan spektrofotometri untuk: (a) bahan makanan dan minuman dalam bentuk bahan padatan, dan (b) bahan makanan dan minuman dalam bentuk bahan cair. 24
- Gambar 4.5. Disain biosensor dalam bentuk stip terdiri atas analit, enzim (A-C) dalam matriks polimer, signal amplifikasi dan convertor, dan signal di dalam mikro komputer (Power Lab). 26
- Gambar 4.6. Skematik biosensor mini dalam bentuk stip terdiri atas elektroda kerja (pasta karbon), elektroda referensi (pastaperak yang dilapis AgCl) dan tempat sampel: (1) bahan strip plastik, (2) strip plastik dioles pasta C dan pasta Ag, (3) Strip yang ditutup plastik (laminating) yang disediakan tempat sampel dan elektroda dihubungkan dengan potentiostat. (a) Untuk deteksi ampermetri, dan (b) untuk deteksi potensiometri 27
- Gambar 5.1. Optimasi redoks mediator $K_4Fe(CN)_6$ dalam sistem FIA pada analisis 1 mM H_2O_2 . Optimasi dilakukan di dalam buffer fosfat pH 6,0 yang mengandung 1 unit/mL peroksidase (POx), volume injeksi 50 l, laju alir 1,5 ml/min. 31
- Gambar 5.2. Respon biosensor terhadap larutan standar (A) H_2O_2 dan (B) kolesterol pada konsentrasi (a) 0,005 mM, (b) 0,01 mM, (c) 0,1 mM, (d) 0,3 mM, (e) 0,5 mM, (f) 1,0 mM, menggunakan redoks mediator $K_4Fe(CN)_6$ dalam buffer fosfat pH 6,0 yang mengandung 1 unit/mL peroksidase (POx), Volume injeksi 50 l, laju alir 1,5 ml/min 32
- Gambar 5.3. Respon biosensor elektrokimia dalam sistem FIA pada penentuan H_2O_2 dengan penyuntikan 1 mM H_2O_2 pada volume injeksi bervariasi: (a) 10 μ l; (b) 30 μ l; (c) 50; (d) 75; (e) 100; dan (f) 150 μ l. Kondisi percobaan: menggunakan 5 mM $K_4Fe(CN)_6$ dalam buffer fosfat pH 6,0 yang mengandung 1 unit/mL Peroksidase (POx): Volume injeksi 50 μ l, laju alir 1,5 ml/min. 33

- Gambar 5.4. Respon biosensor elektrokimia dalam sistem FIA pada penentuan H_2O_2 dengan penyuntikan 1 mM H_2O_2 pada volume injeksi 50 μ l. Kondisi percobaan: menggunakan 5 mM $K_4Fe(CN)_6$ dalam buffer fosfat pH 6,0 yang mengandung 1 unit/mL Peroksidase (POx): Laju alir: (a) 2,0 ml/min, (b) 1,5 ml/min, (c) 1,2 ml/min, (d) 1,0 ml/min, dan (e) 0,8 ml/min. 34
- Gambar 5.5. (A) Bentuk FIA-gram untuk: (a) 0,005 mM, (b) 0,01 mM, (c) 0,1 mM, (d) 0,3 mM, (e) 0,5 mM, (f) 1,0 mM, (g) 3,0 mM, (h), dan 5,0 mM kolesterol standar; (B) Kurva kalibrasi larutan kolesterol standar merupakan rata-rata 3 ulangan. Kondisi percobaan: menggunakan 5 mM $K_4Fe(CN)_6$ dalam buffer fosfat pH 6,0 yang mengandung 1 unit/ml Peroksidase (POx): Volume injeksi 50 μ l, laju alir 1,5 ml/min. 36
- Gambar 5.6. Hasil analisis kadar kolesterol di dalam makanan berlemak ditentukan secara Biosensor elektrokimia dalam sistem FIA dan metode standar Spektrofotometri secara reaksi enzimasi: (\square) daging segar, (\bullet) daging kaleng, dan (Δ) minuman kaleng berlemak. 40
- Gambar 5.7. (A) Bentuk FIA-gram untuk analisis asam urat dengan menggunakan biosensor asam urat: (a) 0,05 mM, (b) 0,1 mM, (c) 0,5 mM, (d) 1 mM, (e) 5 mM asam urat standar; (B) Kurva kalibrasi larutan asam urat standar merupakan rata-rata 3 ulangan. Kondisi percobaan: menggunakan 5 mM $K_4Fe(CN)_6$ dalam buffer fosfat pH 6,0, 1 unit/ml POx, volume injeksi 50 μ l, laju alir 1,5 ml/min. 41
- Gambar 5.8. Respon FIA untuk analisis 1 mM asam urat Kondisi percobaan menggunakan 5 mM $K_4Fe(CN)_6$ dalam buffer fosfat pH 6,0, 1 unit/ml peroksidase (POx), volume injeksi 50 μ l, laju alir 1,5 ml/min. 42
- Gambar 5.8a. Respon FIA untuk analisis 1 mM asam urat secara berulang-ulang ke dalam sistem FIA. Kondisi percobaan menggunakan 5 mM $K_4Fe(CN)_6$ dalam buffer fosfat pH 6,0, 1 unit/ml POx, volume injeksi 50 μ l, laju alir 1,5 ml/min. 43
- Gambar 5.9. Voltammogram CV untuk elektrodeposisi polityramin pada elektroda GC/Pt pada 0.50 V s^{-1} pada 0,1 M tyramin dilarutkan dalam buffer fosfat yang mengandung enzim. Elektrodeposisi dilakukan pada 0.00 V dan +1.65 V *versus* Ag/AgCl sebanyak 5 sweep cycle. 45
- Gambar 5.10. Skema biosensor asam urat (GC/Pt/PTy/UOx) dengan immobilisasi enzim urikase pada matriks polityramin pada permukaan elektroda karbon gelas terplatinasi (GC/Pt). 47
- Gambar 5.11. Respon biosensor asam urat (GC/Pt/PTy/UOx) terhadap larutan standard asam urat, berturut-turut: (a) 0,0 mM, (b) 0,1 mM, (c) 0,5 mM, (d) 0,8 mM, (e) 1,0 mM, (f) 1,3 mM, (g) 1,5 mM, (h) 1,8 mM, (i) 2,0 mM, (j) 2,2 mM, dan (k) 2,5 mM asam urat. Analisis dilakukan pada potensial konstan 0,6 V *vs* Ag/AgCl di dalam buffer fosfat (0,01 M, pH 6,0). Matriks polityramin dibuat secara CV sebanyak 5 sweep cycle seperti pada prosedur percobaan pada Gambar 5.9. 48

- Gambar 5.12. Kurva kalibrasi larutan standar asam urat yang dianalisis menggunakan biosensor asam urat (GC/Pt/PTy/UOx), yaitu rata-rata dari 5 elektroda kerja seperti pada respon elektroda pada Gambar 5.11. Prosedur pembuatan elektroda dilakukan sama seperti pada Gambar 5.9. 49
- Gambar 5.13. Kurva kalibrasi larutan standar asam urat yang dianalisis menggunakan biosensor asam urat (GC/Pt/PTy/UOx) yang mengandung matriks polityramin bervariasi yang dibuat secara CV pada 1-10 sweep cycle. Prosedur pembuatan elektroda sama seperti pada Gambar 5.9. 51
- Gambar 5.14. Kurva kalibrasi larutan standar asam urat di dalam berbagai jenis larutan buffer pada konsentrasi 10 mM, pH 6,0. Biosensor GC/Pt/PTy/UOx dibuat secara CV sebanyak 5 sweep cycle. 52
- Gambar 5.15. Keterulangan biosensor asam urat: lima buah biosensor dibuat pada waktu yang berbeda dari larutan stok berbeda, tetapi menggunakan prosedur sama. Prosedur pembuatan biosensor dan analisis sampel dilakukan sama seperti pada Gambar 5.11. 54
- Gambar 5.16. Stabilitas biosensor asam urat berdasarkan penggunaan dan penyimpanannya. Empat buah biosensor dibuat pada waktu yang sama menggunakan prosedur sama, tetapi variasi perlakuan penyimpanan: (1) biosensor disimpan dalam keadaan kering pada suhu kamar, (2) biosensor disimpan di dalam buffer fosfat pada suhu kamar, (3) biosensor disimpan dalam keadaan kering pada suhu 4 °C, dan (4) biosensor disimpan di dalam larutan buffer pada suhu 4 °C. Prosedur pembuatan biosensor dan analisis sampel dilakukan sama seperti pada Gambar 5.11. 55
- Gambar 5.17. Respon biosensor asam urat terhadap asam urat yang mengandung senyawa interferen (masing-masing 1 mM senyawa interferen). Biosensor asam urat dengan variasi ketebalan membran polityramin yang dibuat secara CV pada 1-10 sweep cycle seperti pada Gambar 5.1. 57
- Gambar 5.18. Penentuan asam urat di dalam sampel standar menggunakan metode analisis biosensor dan metode analisis standar (Metode spektrofotometri-UV-Vis). Plot adalah koefisien korelasi dua jenis metode analisis. 60
- Gambar 5.19. Penentuan asam urat di dalam sampel makanan dan minuman menggunakan biosensor elektrokimia dan metode analisis standar spektrofotometri UV-VIS. Plot adalah koefisien korelasi dua jenis metode analisis. Data analisis adalah pada Lampiran 1. 62
- Gambar 5.20. Voltammogram CV untuk elektrodeposisi polityramin pada elektroda strip pada 0.50 V s⁻¹ pada 0,1 M tyramin dilarutkan dalam buffer fosfat yang mengandung enzim. Elektrodeposisi dilakukan pada 0.00 V dan +1.65 V versus Ag/AgCl sebanyak 10 sweep cycle. 70

- Gambar 5.21. Skema elektroda strip biosensor untuk penentuan asam urat dengan immobilisasi enzim urikase pada matriks polityramin pada permukaan elektroda karbon gelas terplatinasi (GC/Pt): (a) Strip Biosensor A, (b) Strip Biosensor B, (c) Strip Biosensor C, (a) Strip Biosensor D, dan (e) Interface Potentiostat dan Strip Biosensor. 71
- Gambar 5.22. Respon strip biosensor terhadap larutan standard asam urat, berturut-turut: (a) 0,0 mM, (b) 0,1 mM, (c) 0,3 mM, (d) 0,5 mM, (e) 1,0 mM, (f) 1,5 mM, (g) 2,5 mM, (h) 3,5 mM, dan (i) 4,0 mM asam urat. Analisis dilakukan pada potensial konstan 0,6 V vs Ag/AgCl di dalam buffer fosfat (0,01 M, pH 6,0). Matriks polityramin dibuat dibuat secara CV sebanyak 10 sweep cycle seperti pada prosedur percobaan pada Gambar 5.20. 72
- Gambar 5.23. Kurva kalibrasi larutan standar asam urat yang dianalisis menggunakan biosensor asam urat (GC/Pt/PTy/UOx), yaitu rata-rata dari 5 elektroda kerja seperti pada respon elektroda pada Gambar 5.22. Prosedur pembuatan elektroda dilakukan sama seperti pada Gambar 5.20. 73
- Gambar 5.24. Keterulangan strip biosensor asam urat: enam buah biosensor dibuat pada waktu yang berbeda dari larutan stok berbeda, tetapi menggunakan prosedur sama. Prosedur pembuatan biosensor dan analisis sampel dilakukan sama seperti pada Gambar 5.3. 75
- Gambar 5.25. Stabilitas strip biosensor asam urat berdasarkan penggunaan secara berulang-ulang untuk penentuan 1 mM asam urat standar selama 80 kali analisis. Strip biosensor selalu disimpan dalam keadaan kering pada suhu kamar bila tidak dipergunakan. Prosedur pembuatan biosensor dan analisis sampel dilakukan sama seperti pada Gambar 5.20. 76
- Gambar 5.26 Bentuk sampel makanan dan minuman (a) berwujud padat dan (b) berwujud cair yang dikeringkan sampai (c) sampel berbentuk tepung yang siap untuk dilarutkan untuk penentuan asam urat di dalam sampel makanan dan minuman. 77
- Gambar 5.27 Analisis asam urat di dalam berbagai jenis sampel padat menggunakan metode strip biosensor dan metode standar spektrofotometry. 81
- Gambar 5.28 Analisis asam urat di dalam berbagai jenis sampel berwujud cairan setelah perlakuan sampel dengan menggunakan metode strip biosensor dan metode standar spektrofotometry. 83

- Tabel 5.12. Penentuan asam urat dalam berbagai jenis ikan segar menggunakan metode standar (spektrofotometri) dan menggunakan biosensor. Angka adalah hasil rata-rata 3 kali pengukuran. 68
- Tabel 5.13. Deskripsi sampel berbagai jenis makanan yang diduga mengandung asam urat dari sampel bahan padat saat basah dan setelah dikeringkan 78
- Tabel 5.14. Deskripsi sampel berbagai jenis minuman yang diduga mengandung asam urat dari sampel bahan cair dan yang dikonsumsi cair saat berbentuk bahan baku dan setelah dikeringkan 79
- Tabel 5.15. Analisis asam urat dalam berbagai jenis makanan berwujud padatan dengan menggunakan strip biosensor dan metode standar spektrofotometri. 80
- Tabel 5.16. Analisis asam urat dalam berbagai jenis makanan berwujud cairan dengan menggunakan strip biosensor dan metode standar spektrofotometri 83



DAFTAR LAMPIRAN

Halaman

Lampiran 1. Analisis asam urat di dalam sampel makanan dan minuman menggunakan metode analisis biosensor elektrokimia dan Spektrofotometri UV-Vis (Data lengkap masing-masing metode analisis diperlihatkan pada Lampiran 2 dan lampiran 3)	92
Lampiran 2. Analisis asam urat di dalam makanan dan minuman secara biosensor elektrokimia: 1 mg sampel dilarutkan dalam larutan 1 ml Li_2CO_3 (4%), 50 μl sampel disuntikkan ke dalam buffer fosfat, dan analisis dilakukan pada E konstan 0,60 V	94
Lampiran 3. Analisis asam urat di dalam makanan dan minuman secara Spektrofotometri UV-Vis: 1 mg sampel dilarutkan dalam 1 ml Li_2CO_3 (4%), 50 μl sampel dilarutkan dalam 150 μl larutan (50 μl o-dianisidin + 5 μl POx + 5 μl UOx + 40 μl Li_2CO_3) dan analisis pada λ 520 nm selama 10 menit	96
Lampiran 4. Biodata Ketua Peneliti	98
Lampiran 5. Biodata Anggota Peneliti 1	101
Lampiran 6. Biodata Anggota Peneliti 2	102
Lampiran 7. Daftar Publikasi dan Draft Publikasi	105

BAB I

PENDAHULUAN

1.1. Latarbelakang Masalah

Kebutuhan akan instrumen analisis yang memiliki daya analisis akurat, selektif, sensitif, cepat dan sederhana untuk kontrol kualitas makanan dan minuman sangat diperlukan karena dapat memberikan informasi yang tepat tentang komponen penyusun makanan dan minuman, khususnya senyawa-senyawa tertentu seperti kolesterol dan asam urat yang diindikasikan sebagai penyebab penyakit, sehingga memberikan manfaat yang besar pada produsen dan konsumen di dalam produksi dan pemilihan makanan dan minuman yang layak untuk dikonsumsi. Pencarian instrumen analisis untuk penentuan kadar asam urat di dalam sampel makanan dan minuman sangat mendesak karena diketahui senyawa ini dapat menyebabkan beberapa jenis penyakit, dan kehadiran senyawa ini pada kadar tertentu di dalam makanan atau minuman harus dihindarkan (Capar, dkk, 2007). Kontrol kualitas melalui analisis untuk penentuan kadar senyawa tertentu di dalam makanan dan minuman dapat memberikan informasi terhadap kehadiran senyawa yang dapat menyebabkan penyakit, sehingga memudahkan bagi konsumen untuk memilih makanan dan minuman yang layak untuk dikonsumsi sesuai dengan kebutuhan dan kondisi konsumen. Kontrol kualitas makanan dan minuman juga sangat penting dilakukan secara rutin, terutama bagi produsen makanan dan minuman, karena sangat berhubungan dengan kualitas produk yang akan dipasarkan bagi konsumen yang membutuhkan diet terhadap senyawa yang mengandung asam urat.

Permasalahan yang dihadapi adalah sulitnya mendapatkan instrumen analisis yang akurat, selektif dan sensitif terhadap asam urat, sehingga kontrol kualitas makanan dan minuman sulit dilakukan oleh industri makanan dan minuman secara reguler, khususnya industri skala kecil yang belum masional tetapi dikonsumsi oleh masyarakat banyak. Instrumen analisis yang sering dipergunakan untuk penentuan senyawa di atas di dalam makanan dan minuman adalah kolorimetri dan spektrofotometri, kedua metode ini rentan terhadap pengaruh senyawa pengganggu (*interference*), sehingga hasil analisis kurang akurat. Untuk kontrol kualitas makanan dan minuman diperlukan instrumen analisis yang akurat, sensitif, selektif, cepat, sederhana dan dengan biaya analisis relatif murah, yaitu menggunakan biosensor elektrokimia.

Penelitian yang dilakukan adalah membuat rancang bangun biosensor elektrokimia sebagai instrumen analisis untuk kontrol kualitas makanan dan minuman. Penelitian

mencakup penggunaan enzim sebagai komponen biologi aktif pada transduser untuk penentuan analit target. Komponen-komponen biologi aktif akan diimmobilisasi di dalam matriks polimer (yang disintesa secara elektrokimia), dan ditempatkan pada permukaan elektroda, kemudian dirangkai dengan deteksi elektrokimia amperometri dalam sistem statik. Jenis enzim yang akan diimmobilisasi pada permukaan elektroda diantaranya adalah urikase dan peroksidase. Dari hasil penelitian akan diperoleh produk instrumen analisis dalam bentuk rancang bangun biosensor elektrokimia yang memberikan respon sensitif, selektif, akurat, cepat, stabil, keterulangan baik, sederhana, serbaguna, mudah pengoperasian dan dengan biaya analisis relatif murah untuk kontrol kualitas makanan dan minuman.

Dalam penelitian ini dilakukan pembuatan rancang bangun biosensor elektrokimia dengan cara mengimmobilisasi bahan aktif seperti enzim di dalam matriks polimer secara *crosslink* atau secara elektrodeposisi, sehingga komponen biologi aktif dekat dengan transduser dan kemampuannya tetap stabil. Modifikasi biosensor elektrokimia agar memberikan respon yang sensitif dan selektif terhadap asam urat. Tahap kedua penelitian ini adalah membuat biosensor elektrokimia tunggal untuk menghasilkan biosensor elektrokimia dalam sistem statik dengan deteksi amperometri untuk menentukan kadar asam urat di dalam sampel makanan dan minuman.

1.2. Ruang Lingkup Penelitian

Ruang lingkup penelitian tahap 2 diarahkan pada pembuatan rancang bangun biosensor elektrokimia dengan cara mengintegrasikan bahan aktif enzim dengan elektroda dalam deteksi elektrokimia amperometri agar memberikan respon yang sensitif dan selektif terhadap analit target, senyawa asam urat. Kegiatan penelitian yang dilakukan adalah membuat biosensor elektrokimia tunggal untuk menghasilkan biosensor elektrokimia dalam sistem statik untuk mendapatkan instrumen analisis yang handal dan disertai kesederhanaan prosedur analisis. Pengembangan instrumentasi dan perlakuan sampel dilakukan untuk menentukan kadar asam urat secara kuantitatif di dalam sampel makanan dan minuman. Usaha untuk menjadikan biosensor mampu menganalisis sampel volume kecil (μl) menjadi target penelitian agar sistem dapat memberikan respon yang baik terhadap asam urat sebagai senyawa yang paling dihindari keberadaannya oleh masyarakat di dalam produk makanan dan minuman. Dari hasil penelitian diperoleh informasi kadar asam urat di dalam berbagai jenis bahan makanan seperti daging segar dan kaleng, berbagai jenis ikan, berbagai jenis kacang-kacangan, dan berbagai jenis minuman.

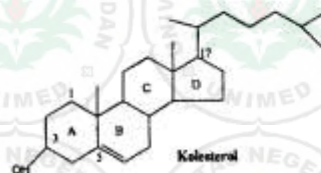
dan metode spektrofotometri (Amundson dan Zhou, 1999). Umumnya penentuan kolesterol dilakukan menggunakan reaksi enzimasasi dengan kolesterol oksidase menghasilkan hidrogen peroksida yang dapat bereaksi dengan senyawa pengabsorpsi seperti *o*-dianisidin menghasilkan senyawa berwarna yang dapat ditentukan dengan UV-Vis (Martin, dkk. 2003, Singh, dkk, 2004, Brahim, dkk. 2001). Penentuan asam urat umumnya dilakukan dengan menggunakan metode kromatografi dengan menggunakan HPLC (Inoue, dkk. 2003, Jen, dkk. 2002; Czauderna dan Kowalczyk, 2000; Marklund, dkk. 2000) dan spektrometri (Hasebe, dkk. 1998; Kahn dan Tipton, 1998). Penentuan asam urat juga telah berhasil dilakukan secara konduksimetri (Castillo-Ortega, dkk.2002) dan amperometri (Inoue, dkk. 2003, Zhang, dkk. 1998). Untuk meningkatkan selektifitas penentuan asam urat, maka analisis dilakukan dengan melibatkan reaksi enzimasasi (Akyilmaz, dkk. 2003, Hong dan Huang, 2003, Galbán, dkk. 2001).

Metode analisis yang dipergunakan untuk menentukan asam urat umumnya dilakukan dengan menggunakan metode kromatografi dengan menggunakan HPLC (Inoue, dkk. 2003, Jen, dkk. 2002; Czauderna dan Kowalczyk, 2000; Marklund, dkk. 2000) dan spektrometri (Hasebe, dkk. 1998; Kahn dan Tipton, 1998). Penentuan asam urat juga telah berhasil dilakukan secara konduksimetri (Castillo-Ortega, dkk.2002) dan amperometri (Inoue, dkk. 2003, Zhang, dkk. 1998). Untuk meningkatkan selektifitas penentuan asam urat, maka analisis dilakukan dengan melibatkan reaksi enzimasasi (Akyilmaz, dkk. 2003, Hong dan Huang, 2003, Galbán, dkk. 2001). Permasalahan utama analisis spektrofotometri adalah pengukuran yang kurang sensitif karena sulit memilih senyawa kimia pengabsorpsi yang tepat. Zat atau senyawa kimia pengabsorpsi kebanyakan bersifat karsinogenik sehingga tidak aman bagi pengguna di laboratorium. Permasalahan lain adalah pendeteksian yang kurang selektif karena pengukuran spektrofotometri memberi respon terhadap senyawa pengganggu terutama senyawa berwarna dan senyawa organik yang mengakibatkan hasil analisis cenderung kurang akurat, sehingga informasi yang salah akan berakibat fatal bagi terapi pasien. Teknik analisis secara spektrofotometri pada umumnya sangat lambat dan proses pelaksanaannya juga sangat kompleks, yaitu melalui tahapan perlakuan sampel dengan menggunakan zat-zat kimia mahal sebelum dianalisis menggunakan instrumen optik. Teknik analisis dengan menggunakan kromatografi sangat sensitif, akan tetapi waktu analisis cukup lama, membutuhkan instrumen yang relatif mahal, biaya analisis tinggi, dan harus dikerjakan oleh orang yang sangat terampil. Biaya perawatan (*running cost*) instrumen juga sangat tinggi (mahal) sehingga tidak ekonomis untuk dipergunakan sebagai instrumen analisis untuk analisis kualitas makanan dan

minuman. Untuk mengatasi permasalahan ini dibutuhkan instrumen analisis dengan menggunakan biosensor elektrokimia, karena memiliki daya analisis sangat sensitif dan selektif, hasil analisis akurat, prosedur analisis sederhana karena penentuan umumnya dilakukan tanpa perlakuan sampel, dan dengan biaya analisis yang relatif rendah. Untuk menguji kualitas makanan dan minuman sangat diperlukan instrumen analisis yang sensitif, selektif, cepat dan dengan biaya analisis murah untuk menghindari bahaya yang lebih fatal bagi kesehatan. Untuk memenuhi kriteria ini, maka instrumen analisis dengan menggunakan biosensor merupakan salah satu alternatif yang baik untuk dikembangkan sehingga pembuatan rancang bangun biosensor elektrokimia sangat tepat dilakukan.

2.2. Kolesterol

Kolesterol ($C_{27}H_{46}O$) dengan berat molekul 386,64 merupakan golongan steroid lemak yang di dalam struktur kimianya mengandung rantai steroid, gugus hidroksi dan ikatan rangkap. Kolesterol sukar larut didalam air, dan dapat larut di dalam pelarut organik misalnya eter, kloroform, benzen, dan alkohol panas. Apabila terdapat dalam konsentrasi tinggi, kolesterol mengkristal dalam bentuk kristal yang tidak berwarna, tidak berasa, tidak berbau, dan mempunyai titik lebur 150-151 °C. Kolesterol sangat dibutuhkan oleh tubuh karena mempunyai peran yang sangat penting, merupakan komponen utama pembentuk membran sel, berfungsi sebagai prekursor utama metabolisme pembentuk provitamin-D, asam empedu, hormon steroid adrenal (hidrokortison dan aldeteron) dan hormon seksual (estrogen dan androgen).

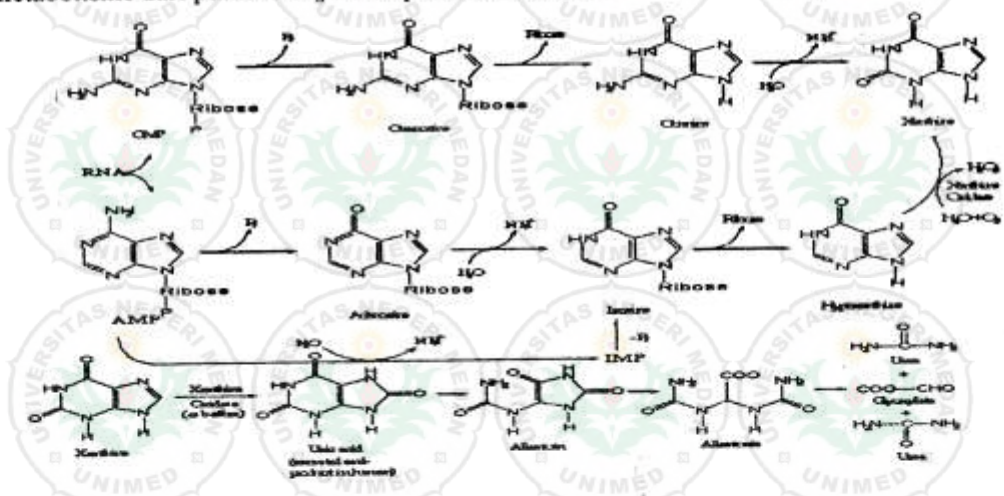


Walaupun kolesterol tersedia dari makanan yang dikonsumsi, sejumlah kolesterol untuk keperluan normal dapat disintesis oleh tubuh. Di dalam serum, kolesterol ditemukan sebagai bentuk senyawa bebas atau terikat bersama trigliserida dalam bentuk senyawa organik yang disebut lipoprotein berupa *low density lipoprotein* (LDL) yang membawa kolesterol keluar dari hati ke jaringan tubuh, dan *high density lipoprotein* (HDL) yang membawa kolesterol keluar dari aliran darah untuk ekskresi. Dalam istilah sehari-hari, LDL disebut sebagai kolesterol “jahat”, dan HDL disebut sebagai kolesterol “baik”. Diperkirakan dua pertiga dari total kolesterol di dalam darah berupa LDL. Walaupun kolesterol sangat penting bagi kehidupan, namun keberadaan kolesterol sering dihubungkan dengan penyakit jantung, karena berdasarkan beberapa hasil penelitian telah

ditemukan adanya korelasi positif antara kadar kolesterol di dalam serum dengan terjadinya penyakit jantung. Apabila metabolisme kolesterol terganggu, senyawa kolesterol yang terdapat didalam serum menjadi terakumulasi dalam bentuk senyawa kolesteryl ester pada dinding arteri. Jadi, kadar kolesterol serum yang tinggi merupakan indikator ketidaknormalan metabolisme lemak yang dapat mengakibatkan penyakit *arterisclerosis* dan darah tinggi.

2.3. Asam Urat Dalam Makanan dan Minuman

Asam urat adalah nama lain dari 2,6,8 - trioksiapurin dengan rumus molekul $C_5H_4N_4O_3$ dan memiliki berat molekul 168,11. Asam urat memiliki bentuk kristal yang berwarna putih kekuningan, tidak berasa dan tidak berbau. Senyawa ini merupakan hasil akhir dari metabolisme purin, baik purin yang berasal dari bahan pangan maupun dari hasil pemecahan purin asam nukleat tubuh. Di dalam bahan pangan, purin terdapat di dalam asam nukleat berupa nukleoprotein. Di dalam proses metabolisme, di dalam usus asam nukleat dibebaskan dari nukleoprotein oleh enzim pencernaan, selanjutnya, asam nukleat ini dipecah lagi menjadi mononukleotida, dan dihidrolisis menjadi nukleosida yang dapat secara langsung diserap oleh tubuh, sedangkan sebagian dipecah lebih lanjut menjadi purin dan pirimidin, dan teroksidasi menjadi asam urat. Asam urat terbentuk dari hasil metabolisme ikatan kimia yang mengandung nitrogen yang terdapat dalam asam nukleat yang disebut purin. Asam urat merupakan produk akhir yang diekskresikan dari pemecahan purin pada manusia. Pada manusia normal 18 -20% dari asam urat yang hilang dipecah oleh bakteri menjadi CO_2 dan amonia di usus dan diekskresikan melalui feses. Reaksi metabolisme dari purin ditunjukkan pada Gambar 2.1.



Gambar 2.1. Jalur alternatif proses metabolisme pembentukan asam urat di dalam tubuh makhluk hidup

Asam urat dapat diabsorpsi melalui mukosa usus dan diekskresikan melalui urin. Misalnya pada manusia, sebagian purin dalam asam nukleat yang dimakan akan langsung diubah menjadi asam urat tanpa terlebih dahulu digabung dengan asam nukleat tubuh. Dengan demikian pembentukan purin tersedia dalam jumlah yang mencukupi di dalam tubuh dan purin bebas dari bahan pangan tidak berfungsi sebagai pembentuk asam nukleat jaringan tubuh.

Sifat kimia asam urat adalah dapat mengurai pada suhu 250°C tanpa meleleh, larut di dalam gliserol, asam sulfat, larutan lithium karbonat, natrium asetat, natrium posfat, dan secara umum sangat larut di dalam alkali. Asam urat tidak larut dalam air mendidih, alkohol, eter dan kloroform. Seperti senyawa purin lainnya, asam urat menyerap energi pada daerah ultraviolet dan hal ini sangat tergantung pada pH. Asam urat tidak memiliki gugus karboksilat, tetapi senyawa ini bersifat asam karena salah satu atom hidrogen pada cincin beranggota lima mudah mengurai. Sifat kimia lainnya, pKa dari asam urat adalah 5,7 dan stabil pada hidrolisis, tetapi kestabilannya berkurang dengan meningkatnya substitusi nitrogen. Asam urat sangat mudah dioksidasi dengan berbagai senyawa menghasilkan berbagai produk. Pada umumnya oksidasi dengan alkali akan menyerang cincin pirimidin, sedangkan oksidasi dengan asam menyerang cincin imidazol. Sebagai contoh oksidasi asam urat dengan KMnO_4 menghasilkan allantoin sedangkan oksidasi asam urat dengan asam nitrat atau asam klorida akan menghasilkan alloxan.

Salah satu penyebab meningkatnya asam urat dalam tubuh adalah semakin banyak makanan yang mengandung purin sehingga pembentukan purin dalam tubuh meningkat sesuai konsumsi dari makanan. Senyawa purin yang berlebihan dapat berasal dari berbagai sumber makanan, antara lain makanan kaleng seperti kornet, sarden dan ekstrak daging, makanan laut seperti udang, kerang dan kepiting, jeroan seperti hati, ginjal, limpa, babat, usus, paru, otak, kacang-kacangan kering beserta olahannya, keju, susu dan telur, kaldu kental, buah-buahan seperti durian, avokad, nenas, dan air kelapa, sayuran seperti daun bayam, daun singkong, kangkung, asparagus, buncis dan kembang kol (Utami, 2003). Secara normal tubuh manusia mempunyai mekanisme tersendiri untuk membuang asam urat dari dalam tubuh, yaitu melalui feses dan urin. Asam urat bisa berlebih dalam tubuh, hal ini bisa terjadi akibat menurunnya kemampuan tubuh untuk membuang asam urat melalui urin karena kelainan pada ginjal. Berdasarkan penelitian laboratorium klinis, kadar asam urat normal untuk wanita berkisar 2,4 - 5,7 mg/dL dan untuk pria berkisar 3,4-7 mg/dL (Krisnatuti, 2001). Dalam jumlah normal dalam tubuh asam urat tidak akan menimbulkan masalah, tetapi apabila sudah berlebih akan menjadikan asam urat

menumpuk pada persendian mengakibatkan arthritis gout, yang mengganggu fungsi sendi berupa nyeri atau kerusakan tulang sendi (Centronic, 2003). Penumpukan asam urat juga bisa terjadi pada ginjal yang bisa mengakibatkan kerusakan ginjal. Penanggulangan terhadap penyakit ini dapat dilakukan dengan mengatur menu makanan sedemikian rupa agar lebih banyak makanan dengan kandungan purin rendah, mengkonsumsi obat-obatan, menganalisa asam urat dalam darah atau dengan mengontrol kadar asam urat dalam makanan dengan menganalisis kadarnya.

Di dalam tubuh manusia, asam urat merupakan hasil akhir metabolisme purin yang terkandung pada makanan yang berprotein tinggi. Asam urat bisa juga terdapat langsung pada makanan yang mengandung purin tinggi atau menghambat pengeluaran asam urat melalui ginjal. Beberapa contoh makanan tersebut yaitu udang, kerang, kepiting, jeroan seperti hati, ginjal, limpa, babat, usus, paru, otak, makanan kaleng seperti kornet dan sarden, ekstrak daging, kacang-kacangan dalam bentuk kering seperti kacang tanah, kacang kedelai, kacang hijau dan makanan olahannya seperti tempe, tauco, tauge, oncom dan susu kedelai, melinjo, emping melinjo, bayam, buncis, kembang kol, kangkung, asparagus, keju, susu, telur, alkohol seperti bir, wiski, anggur, tape, tuak dan minuman hasil fermentasi, buah durian, alpukat, nanas dan air kelapa. Secara normal tubuh manusia mempunyai mekanisme tersendiri untuk membuang asam urat dari dalam tubuh, yaitu melalui feses dan urin. Kadar asam urat berlebih dalam tubuh dapat diakibatkan oleh menurunnya kemampuan tubuh membuang tubuh asam urat melalui urin karena kelainan pada ginjal.

Asam urat merupakan hasil akhir dari metabolisme purin, baik purin yang berasal dari bahan pangan maupun dari hasil pemecahan purin asam nukleat tubuh. Dalam serum, urat terutama berada dalam bentuk natrium urat, sedangkan dalam saluran urin, urat dalam bentuk asam urat. Enzim penting yang berperan dalam sintesis asam urat ini adalah xantin oksidase yang sangat aktif bekerja dalam hati, usus halus dan ginjal. Tanpa bantuan enzim ini, asam urat tidak dapat dibentuk. Penanggulangan terhadap penyakit asam urat dapat dilakukan dengan mengatur menu makanan, seperti membatasi makanan yang mengandung purin, jumlah kalori sesuai dengan kebutuhan, rendah protein, rendah lemak serta konsumsi tinggi cairan (minuman) yang dapat membantu pengeluaran asam urat melalui urin.

2.4. Biosensor Sebagai Instrumen Analisis

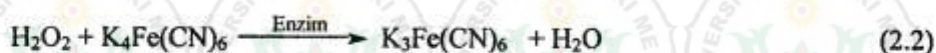
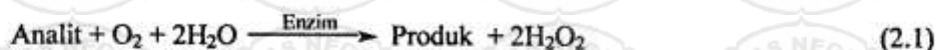
Pengembangan biosensor dengan menggunakan komponen biologi untuk penentuan analit sangat menarik dalam kimia analisis dan sangat tepat untuk penentuan sampel

makanan dan minuman. Prinsip dasar biosensor adalah mengintegrasikan komponen biologi aktif dengan *transducer* untuk menghasilkan signal elektronik yang dapat diukur (Hall, 1991). Biosensor merupakan instrumen analisis yang sangat penting karena mempunyai daya analisis selektif dan sensitif terhadap analit sehingga dapat menentukan kadar senyawa pada konsentrasi sangat rendah. Peralatan ini mempunyai kelebihan dalam kesederhanaan penganalisan karena penentuan biasanya dilakukan tanpa perlakuan sampel sehingga mudah dilakukan oleh orang yang kurang terampil. Disain instrumen dengan deteksi elektrokimia sangat sederhana dan handal, bila dirangkaikan dengan komponen biologi aktif pada transduser akan menjadikan penganalisan menjadi sangat selektif, sensitif dan akurat (Vo-Dingh dan Cullum, 2000). Komponen-komponen biologi yang dapat dipergunakan untuk pengembangan biosensor diantaranya enzim (Liang dan Yang, 2000; Karube dan Nomura, 2000), mikroorganisme (Konig, dkk. 1999), jaringan tanaman dan hewan (Campanella, dkk. 1990; Wijesuriya dan Rechnitz, 1993). Sel dan kultur jaringan tanaman yang terdapat pada kelapa (Lima, dkk.1997), kentang (Takemoto, dkk. 1997), asparagus (Oungpipat, dkk. 1995), jeruk (Horie dan Rechnitz, 1995), bayam (Qin, dkk.1999), kedelai (Bassi dan McGrath, 1999) dan apel (Cummings, dkk.1998) mengandung enzim yang dapat digunakan sebagai komponen biosensor.

Biosensor elektrokimia dengan deteksi amperometri dan potensiometri mempunyai kelebihan dalam hal sensitifitas, selektifitas dan linieritas pengukuran. Penentuan secara amperometri didasarkan pada pengukuran arus (i) dalam sel elektrokimia, sedangkan pengukuran potensiometri didasarkan pada pengukuran potensial (E) di dalam reaksi redoks (Skoog dan Leary, 1992). Deteksi amperometri mempunyai kelebihan dalam sensitifitas dan selektifitas penganalisan sehingga penentuan secara elektrokimia masih didominasi oleh metode amperometri (Albert, dkk. 2000). Metode potensiometri sangat menarik terutama dalam hal lebar skala linieritas pengukuran sehingga dapat menentukan senyawa konsentrasi rendah sampai tinggi, serta menggunakan peralatan sederhana dan murah, misalnya pH meter yang dapat di jangkau oleh hampir semua laboratorium (Situmorang, dkk. 1993). Akan tetapi, penentuan potensiometri dapat menjadi lebih handal bila menggunakan elektroda ion selektif (ISE). Untuk meningkatkan sensitifitas dan stabilitas biosensor diperlukan teknik immobilisasi agar komponen biologi sangat dekat terhadap transduser. Beberapa metode yang dipergunakan untuk mengimmobilisasi komponen biologi diantaranya adsorpsi, pengikatan fisik (*entrapment*), pengikatan secara kimia (*crosslinking and self-assembly*) dan secara elektrokimia (Cosnier, 1999). Teknik immobilisasi di atas akan dipergunakan pada disain biosensor yang direncanakan dalam

usulan penelitian ini. Pemilihan matriks dalam disain biosensor sangat penting karena berhubungan dengan stabilitas biosensor, dapat berupa polimer atau gel (Yao dan Takashima, 1998). Untuk menghasilkan lapisan matriks dengan keterulangan tinggi maka sangat baik bila menggunakan polimer yang dibuat melalui elektropolimerisasi, karena teknik polimerisasi elektrokimia dapat menghasilkan lapisan tipis yang homogen dengan ketebalan sama dan merata (Emr dan Yacynych, 1995).

Prinsip dasar reaksi enzimasi untuk penentuan dalam biosensor elektrokimia dalam sistem FIA diperlihatkan pada persamaan reaksi 2.1 dan 2.2. Analit berupa kolesterol dan asam urat dioksidasi menjadi produk dan dihasilkan hidrogen peroksida (H_2O_2) yang dapat dideteksi secara potensiometri. Karena hidrogen peroksida tidak dapat dideteksi langsung secara potensiometri maka sistem elektrokimia dibuat dalam deteksi tidak langsung dengan cara mereduksi atau mengoksidasi H_2O_2 dengan redoks mediator $K_4Fe(CN)_6$ agar menghasilkan potensial yang dapat dideteksi secara potensiometri.



Perubahan ferrosianida menjadi ferisianida dideteksi secara potensiometri dalam sistem FIA. Potensial redoks dideteksi di dalam sel elektrokimia menggunakan elektroda W vs Ag/AgCl, yaitu potensial yang terbentuk dalam sel elektrokimia secara stoikiometri adalah setara dengan konsentrasi analit di dalam sampel. Analit dapat berupa kolesterol, asam urat dan senyawa lain yang dapat menghasilkan H_2O_2 dalam reaksi enzimasi.

Biosensor dengan menggunakan enzim sebagai bahan aktif sangat menguntungkan karena dapat meningkatkan selektivitas penganalisan karena reaksi katalis hanya terjadi secara selektif dengan analit target yang sesuai dengan enzim yang dipergunakan. Prinsip dasar reaksi enzimasi penentuan asam urat dalam sistem statik dalam deteksi amperometri diperlihatkan pada persamaan reaksi (2.3) dan (2.4).



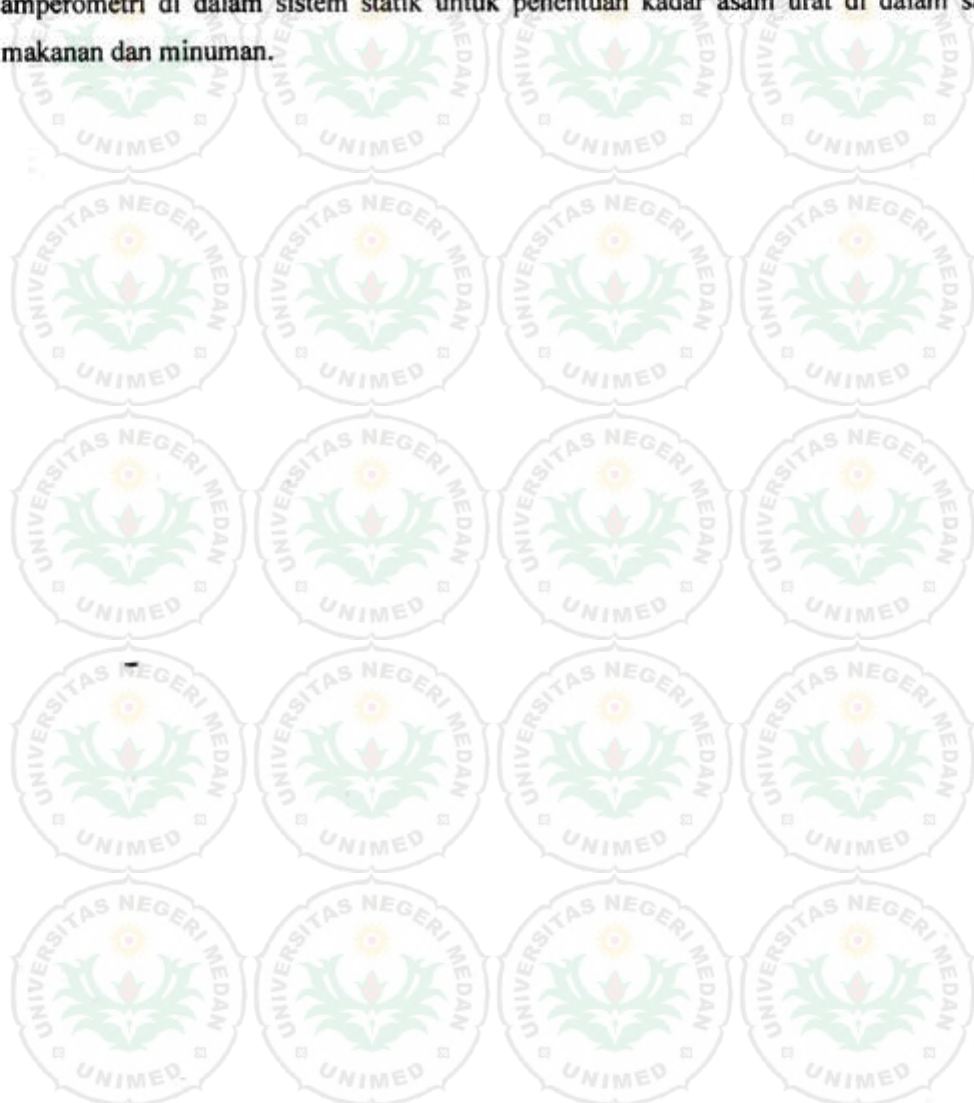
Analit berupa asam urat dioksidasi menjadi produk dan dihasilkan hidrogen peroksida (H_2O_2) yang dapat dideteksi secara amperometri dalam bentuk arus (i , μA) sehingga kadar asam urat yang bterdapat di dalam sampel adalah setara dengan arus yang dihasilkan di dalam reaksi enzimasi.

2.5. Rumusan Masalah dan Batasan Masalah

Pencarian instrumen analisis untuk kontrol kualitas makanan dan minuman sangat penting, terutama untuk mendapatkan metode analisis untuk penentuan kadar senyawa yang dapat menyebabkan penyakit seperti asam urat. Kontrol kualitas makanan dan minuman juga sangat mendesak, terutama bagi produsen, karena sangat berhubungan dengan kualitas makanan dan minuman yang akan dipasarkan kepada konsumen, terutama bagi konsumen yang membutuhkan diet terhadap senyawa tertentu seperti kolesterol dan asam urat. Permasalahan yang dihadapi adalah sulitnya mencari instrumen analisis yang akurat, sensitif, selektif, cepat, sederhana dan dengan biaya analisis rendah untuk penentuan asam urat di dalam sampel makanan. Metode analisis yang dipergunakan selama ini adalah metode kolorimetri dan spektrofotometri yang rentan terhadap senyawa pengganggu (interferen). Metode analisis kromatografi menggunakan HPLC diketahui sensitif untuk penentuan asam urat, akan tetapi penganalisisan menggunakan HPLC membutuhkan peralatan yang sangat mahal dan biaya operasionalnya juga sangat tinggi, sehingga sulit dijangkau oleh laboratorium. Untuk mengatasi permasalahan ini dibutuhkan instrumen analisis yang akurat, sensitif, selektif, cepat, sederhana dan dengan biaya analisis rendah, yaitu menggunakan biosensor elektrokimia.

Pengembangan biosensor elektrokimia sebagai instrumen analisis untuk kontrol kualitas makanan dan minuman pada tahun pertama dibatasi pada penentuan kadar kolesterol dan asam urat dalam sistem FIA. Teknologi biosensor yang dikembangkan mempunyai peranan yang sangat penting dalam meningkatkan kualitas kesehatan konsumen melalui penemuan instrumen analisis yang selektif, akurat, cepat, stabil, keterulangan baik, sederhana, mudah pengoperasian dan biaya analisis relatif murah. Penelitian dilakukan dengan membuat rancang bangun biosensor dengan deteksi elektrokimia dalam sistem statik dan FIA. Komponen biologi yang diintegrasikan diantaranya adalah enzim kolesterol oksidase, urikase, dan peroksidase. Biologi aktif yang dipilih sesuai dengan target analit dipergunakan sebagai komponen biosensor dengan menggunakan elektroda kerja W vs $Ag/AgCl$. Selanjutnya biosensor dalam sistem FIA diaplikasikan untuk penentuan beberapa jenis analit di dalam sampel makanan dan minuman sebagai bukti bahwa metode analisis yang dikembangkan ini memberikan arah yang tepat untuk pengembangan biosensor elektrokimia dalam sistem FIA untuk kontrol kualitas makanan dan minuman, khususnya penentuan senyawa kolesterol dan asam urat di dalam sampel makanan dan minuman.

Pengembangan biosensor elektrokimia sebagai instrumen analisis untuk kontrol kualitas makanan dan minuman pada tahap ke dua dibatasi pada penentuan kadar asam urat. Teknologi biosensor yang diusulkan akan mempunyai perana yang sangat penting dalam menemukan instrumen analisis yang selektif, akurat, cepat, stabil, keterulangan baik, sederhana, mudah pengoperasian dan biaya analisis relatif murah. Komponen biologi yang diimmobilisasi pada matriks polityramin diantaranya adalah enzim urikase dan peroksidase. Polityramin dipolimerisasi secara elektrokimia pada permukaan elektroda *disk* GC/Pt sebagai matriks untuk immobilisasi enzim karena mempunyai gugus amino bebas yang dapat berikatan secara kovalen dengan gugus karboksil yang terdapat pada komponen biologi, menghasilkan modifikasi elektroda. Selanjutnya biosensor dirangkaikan dengan detektor amperometri di dalam sistem statik untuk penentuan kadar asam urat di dalam sampel makanan dan minuman.



BAB III

TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN

3.1. Tujuan Penelitian

Tujuan umum penelitian yang diusulkan adalah membuat rancang bangun biosensor elektrokimia sebagai instrumen analisis untuk kontrol kualitas makanan dan minuman yang dapat dipergunakan sebagai metode analisis standar untuk penentuan kadar kolesterol, asam urat, dan asam oksalat di laboratorium. Tujuan khusus penelitian adalah untuk:

- (1) Membuat rancang bangun biosensor elektrokimia sebagai instrumen analisis yang sensitif, selektif, akurat, cepat, dan stabil terhadap analit kolesterol dan asam urat. Biosensor elektrokimia mempunyai keterulangan baik, sederhana, serbaguna, mudah pengoperasian dan dengan biaya analisis yang relatif murah untuk kontrol kualitas makanan dan minuman.
- (2) Merancang biosensor elektrokimia tunggal dan multibiosensor dengan deteksi amperometri dan potensiometri dalam sistem statik dan flow injeksi analisis (FIA) sebagai instrumen standar untuk penentuan kadar kolesterol dan asam urat di dalam sampel makanan dan minuman.
- (3) Melakukan immobilisasi enzim sebagai komponen biologi aktif pada permukaan elektroda sebagai transduser untuk menghasilkan biosensor yang selektif, sensitif, stabil (umur pemakaian tahan lama), keterulangan tinggi, dan bebas dari pengaruh senyawa pengganggu (*interference*) untuk penentuan kadar kolesterol dan asam urat.
- (4) Memodifikasi instrumen analisis untuk menghasilkan prototipe biosensor elektrokimia dalam ukuran portabel sehingga mudah dibawa untuk penentuan kolesterol dan asam urat di dalam berbagai jenis sampel makanan dan minuman.
- (5) Memberikan kontribusi ilmiah melalui publikasi di jurnal ilmiah internasional dan nasional terakreditasi tentang pengembangan metode analisis standar, yaitu biosensor elektrokimia untuk penentuan analit tertentu di dalam sampel makanan dan minuman.
- (6) Menghasilkan bahan dokumen untuk rencana aplikasi paten rancang bangun biosensor elektrokimia sebagai instrumen analisis untuk penentuan analit di dalam sampel makanan dan minuman, yang akan dapat dipergunakan sebagai instrumen analisis untuk kontrol kualitas makanan dan minuman, sehingga suatu saat dapat diproduksi secara massal untuk tujuan komersil.

3.2. Manfaat Penelitian

Manfaat hasil penelitian adalah untuk mendapatkan instrumen analisis yang memiliki daya analisis akurat, selektif, sensitif, cepat dan sederhana untuk kontrol kualitas makanan dan minuman sangat diperlukan karena dapat memberikan informasi yang tepat tentang komponen penyusun makanan dan minuman, khususnya senyawa-senyawa tertentu seperti kolesterol dan asam urat yang diindikasikan sebagai penyebab penyakit, sehingga memberikan manfaat yang besar pada produsen dan konsumen di dalam produksi dan pemilihan makanan dan minuman yang layak untuk dikonsumsi. Kontrol kualitas melalui analisis untuk penentuan kadar senyawa tertentu di dalam makanan dan minuman dapat memberikan informasi terhadap kehadiran senyawa yang dapat menyebabkan penyakit, sehingga memudahkan bagi konsumen untuk memilih makanan dan minuman yang layak untuk dikonsumsi sesuai dengan kebutuhan dan kondisi konsumen. Kontrol kualitas makanan dan minuman juga sangat penting dilakukan secara rutin, terutama bagi produsen makanan dan minuman, karena sangat berhubungan dengan kualitas produk yang akan dipasarkan bagi konsumen yang membutuhkan diet terhadap senyawa kolesterol dan asam urat.

Hasil penelitian tahap pertama adalah pembuatan biosensor elektrokimia dalam sistem FIA yang memberikan respon terhadap analit kolesterol dan asam urat. Sistem deteksi elektrokimia diarahkan menggunakan detektor potensiometri dalam sistem FIA bertujuan untuk meningkatkan kecepatan dan kesederhanaan prosedur analisis. Pengembangan instrumentasi dilakukan agar biosensor dapat dipergunakan untuk menentukan kadar kolesterol dan asam urat secara kuantitatif di dalam sampel makanan dan minuman. Keberhasilan tahap pertama penelitian ini akan menjadi penentu di dalam langkah-langkah penelitian yang akan dilakukan pada tahap ke dua dan ke tiga pada tahun berikutnya.

Hasil penelitian tahap kedua adalah rancang bangun biosensor elektrokimia dalam sistem statik sebagai instrumen analisis yang standar dan mudah digunakan di Laboratorium maupun di lapangan untuk penentuan asam urat secara amperometri. Hasil penelitian tahap pertama dipergunakan sebagai dasar dalam pengembangan biosensor untuk ukuran kecil yang dilakukan pada tahun ke tiga. Sedangkan hasil penelitian tahap ketiga adalah model instrumen analisis berupa strip biosensor sebagai instrumen standar untuk kontrol kualitas makanan dan minuman

BAB IV

METODE PENELITIAN

Metode penelitian yang dilakukan selama 3 tahun (Tahun 2006-2008) dengan tiga jenis pengembangan biosensor dibuat dalam tiga bagian, yaitu metode penelitian tahap I dalam sistem flow injeksi analisis (FIA) dalam deteksi potensiometri, metode penelitian tahap II dalam sistem statik dalam deteksi amperometri, dan metode penelitian tahap III adalah pembuatan rancang bangun biosensor untuk model strip biosensor. Secara terperinci masing-masing metode penelitian dijelaskan berikut ini.

4.1. Metode Penelitian Tahap I Dalam Sistem FIA

Metode penelitian tahap pertama tahun 2006 adalah terdiri atas Zat kimia dan Larutan, Penyediaan Larutan, penyediaan sampel penentuan kolesterol, penyediaan sampel penentuan asam urat, peralatan, optimasi sistem FIA, kalibrasi instrumen FIA, selektifitas biosensor dalam sistem FIA, penentuan kolesterol, penentuan asam urat, organisasi dan analisis data, masing-masing dijelaskan secara terperinci berikut ini.

4.1.1. Zat kimia dan Larutan

Zat kimia yang digunakan terdiri atas kolesterol (99%+), asam urat, kalium ferrosianida, kalium klorida, NaHCO_3 , isopropanol, Triton X-100 semua diperoleh dari Sigma Chem. Co. Enzim yang digunakan dalam penelitian adalah kolesterol esterase (CE) 200 unit/mg dari *porcine pancreas* (EC 3.1.1.13), kolesterol oksidase (COx) 33 unit/mg dari *pseudomonash* (E.C.1.1.3.6), Urikase, E.C 1.7.3.3 (UOx), dan peroksidase (POx) 175 unit/mg dari *horse radish* (E.C.1.11.1.7.2). Berbagai jenis zat lain yang tidak terperinci diperoleh dari Sigma Chem. Co., Ajac Chem., Merk dan BioLab.

4.1.2. Penyediaan Larutan

Larutan enzim dibuat dengan cara melarutkannya di dalam air sesuai dengan unit yang dibutuhkan. Larutan Buffer dibuat dengan menimbang 1,36 gr ($\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$) kemudian dilarutkan dengan aquades sampai tanda batas dalam labu ukur 1 liter. KOH digunakan untuk mengatur pH yang diinginkan. Redoks Mediator Ferrosianida dibuat dengan cara melarutkan 422,4 mg senyawa $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ dalam 200 ml larutan buffer fosfat (10 mM, pH 6,0) yang sudah bebas oksigen. Oksigen dibebaskan dengan cara mengalirkan gas N_2 selama 15 menit. Teknik pembuatan larutan kolesterol dan larutan buffer untuk reaksi enzimasi penentuan kolesterol dijelaskan secara terperinci pada studi sebelumnya (Silalahi, dkk.1997), yaitu dengan menggunakan pengemulsi isopropanol dan triton X-100 untuk

menjadikan kolesterol dapat larut sempurna di dalam air sehingga reaksi enzimasasi tidak terhambat. Dalam penelitian ini digunakan larutan standar kolesterol yang dilarutkan di dalam 1% isopropanol dan 1% Triton X-100. Larutan standar kolesterol baku (10 mM) dibuat dengan melarutkan 193,34 mg kolesterol dalam larutan 5 mL Triton X-100 dan 5 ml isopropanol di dalam labu ukur 50 ml, kemudian larutan dipanaskan perlahan-lahan pada 40°C. Setelah kolesterol larut sempurna, diencerkan dengan air sampai batas volume. Sedangkan pembuatan larutan asam urat dilakukan dengan cara melarutkan kolesterol di dalam larutan 0,04% Li_2CO_3 dengan cara memanaskan secara perlahan sampai asam urat melarut. Stok larutan kolesterol standar dan asam urat standar stok disimpan di dalam kulkas (4°C) bila tidak digunakan, dan dihangatkan kembali apabila menggunakannya.

4.1.3. Penyediaan Sampel Penentuan Kolesterol Secara FIA

Sampel daging segar sebanyak 250 gr dipotong menjadi potongan-potongan kecil kemudian diblender sampai halus dan disimpan dalam beker glass yang ditutup dengan aluminium foil dan sampel disimpan dalam lemari es pada suhu 4°C sebelum digunakan. Kemudian dari sampel tersebut ditimbang 4 gr dan dilarutkan dalam 10 ml kloroform di dalam tabung reaksi dan ditutup dengan aluminium foil lalu dibiarkan selama 30 menit, setelah itu disaring dengan kertas saring Whatman No.4. filtrat yang diperoleh dievaporasi lalu ditambahkan 5 ml buffer pospat 10 mM pH yang mengandung surfaktan (isopropanol 1% dan triton X-100 1%).

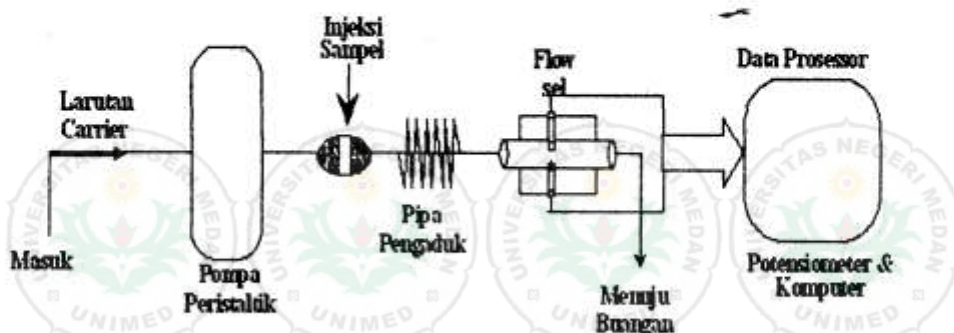
4.1.4. Penyediaan Sampel Penentuan Asam Urat Secara FIA

Sampel daging segar sebanyak 100 g sampel daging segar dipotong menjadi bagian-bagian kecil kemudian diblender sampai halus dan disimpan dalam botol plastik dan kemudian disimpan dalam lemari es pada suhu 4°C sebelum digunakan. Dari sampel tersebut ditimbang 1 g, kemudian ditambahkan 2 mL 0,04% Li_2CO_3 didalam tabung reaksi. Campuran dipanaskan pada suhu 80-100 °C selama 60 menit. Campuran didinginkan, kemudian disentrifusi selama 30 menit. Sentrifugat yang diperoleh disimpan untuk dianalisis sesuai dengan kondisi optimum.

4.1.5. Peralatan Sistem FIA

Peralatan yang dipergunakan adalah pompa peristaltik (Julabo), potensiometer (Keithley 199 DMM, USA), elektroda wolfram (W) dan Ag/AgCl (BAS) di dalam sel elektrokimia (flow sel) yang dirangkai dengan mikrokomputer (Powerlab ADI Instrumen, Australia). Peralatan pendukung adalah *water bath thermostat*, pipa selang silika 0,1 - 0,2 mm (Fison Co.), dan jarum suntik mikro (Hamilton Co.). Sistem flow injeksi (FIA)

dirangkai dengan mengintegrasikan pompa peristaltik, sel elektrokimia di dalam flow sel, dan detektor seperti diperlihatkan pada Gambar 4.1.



Gambar 4.1. Disain rancang bangun biosensor elektrokimia dalam sistem flow injeksi analisis untuk penentuan kolesterol dan asam urat.

4.1.6. Optimasi Sistem FIA

Untuk mendapatkan kondisi optimum dilakukan prosedur optimasi terhadap beberapa faktor yang sangat mempengaruhi respon elektroda dalam sistem FIA. Faktor-faktor yang dioptimasi adalah (1) konsentrasi redoks mediator, (2) pH larutan buffer, (3) kecepatan laju alir, (4) volume injeksi sampel, (5) konsentrasi surfaktan, dan (6) reaksi inkubasi enzim. Optimasi pengaruh konsentrasi redoks mediator ferrosianida terhadap sensitifitas elektroda dilakukan dengan cara menyuntikkan 50 μl larutan standar H_2O_2 kedalam carrier stream yang mengandung ferrosianida pada skala konsentrasi 0.1-10 mM $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$. Respon yang memberikan potensial tertinggi dipilih sebagai kondisi optimum, dan selanjutnya digunakan dalam prosedur optimasi parameter yang lain. Optimasi terhadap pH larutan buffer dilakukan dengan variasi pH larutan carrier stream pada skala pH (4.5-8.0) kemudian menyuntikkan 1 mM H_2O_2 standar kemudian potensial reaksi redoks (E) di ukur untuk mencari kondisi yang paling optimum. Optimasi laju alir larutan carrier stream dilakukan dengan variasi kecepatan 1.0-3.0 ml/menit dengan cara mengatur kecepatan laju alir pada kontrol pompa peristaltik, kemudian menyuntikkan 1 mM H_2O_2 standar ke dalam sistem FIA. Optimasi jumlah volume sampel dilakukan pada variasi volume penyuntikan (10-100) μl H_2O_2 standar. Potensial elektroda diukur untuk mendapatkan bentuk dan tinggi puncak kromatogram FIA paling simetris dan sensitif. Optimasi inkubasi enzim dilakukan pada 1-20 menit, potensial diukur untuk mendapatkan bentuk dan tinggi puncak kromatogram FIA yang paling simetri dan sensitif. Optimasi reaksi inkubasi dilakukan terhadap kolesterol dengan kolesterol oksidase dan asam urat dengan urikase.

4.1.7. Kalibrasi Instrumen FIA

Setelah rancang bangun biosensor elektrokimia dalam sistem FIA telah dibuat maka instrumen analisis dikalibrasi untuk melihat respon FIA. Kondisi percobaan dipilih dengan parameter optimum, kemudian dikalibrasi dengan menyuntikkan 50 μl H_2O_2 pada konsentrasi seri. Potensial yang dihasilkan dibuat dalam kurva kalibrasi satandar. Setelah sistem FIA memberikan respon yang sensitif terhadap H_2O_2 standar maka sistem FIA telah dapat dipergunakan untuk analisis analit (kolesterol atau asam urat). Pada kondisi optimum untuk masing-masing parameter dilakukan penentuan kadar kolesterol di dalam sampel daging segar dan daging kaleng, dan penentuan kadar asam urat di dalam sampel berbagai jenis daging segar, minuman berlemak dan kacang-kacangan.

4.1.8. Selektifitas Biosensor Dalam Sistem FIA

Selektifitas biosensor terhadap zat pengganggu (*interference*) dipelajari menggunakan beberapa jenis analit yang dianggap potensial sebagai pengganggu yang terdapat di dalam sampel makanan dan minuman, diantaranya adalah asam urat, asam amino, urea, asam oksalat, parasetamol, glukosa, fruktosa, dan asam askorbat.

4.1.9. Penentuan Kolesterol Secara FIA

Penentuan kolesterol dilakukan menggunakan biosensor elektrokimia dalam sistem FIA seperti dirangkaikan pada Gambar 4.1. Beberapa parameter percobaan dioptimasi seperti yang dilakukan pada penelitian sebelumnya (Situmorang, dkk., 1998). Penyediaan larutan kolesterol standar dan sampel dijelaskan pada Situmorang, dkk 2001). Analisis kolesterol dilakukan dengan cara menyuntikkan 50 μl larutan standar seri ke dalam injeksi sampel, dan reaksi enzimasi diamati dengan cara pengukuran signal (potensial elektroda, E) menggunakan mikrokomputer. Signal selanjutnya diubah menjadi konsentrasi kolesterol (mM). Selanjutnya biosensor diaplikasikan untuk penentuan kolesterol di dalam sampel makanan berupa daging segar dan daging kaleng. Sebagai pembanding terhadap metode analisis yang dikembangkan maka dilakukan penentuan kolesterol secara spektrofotometri dengan menggunakan reaksi enzimasi. Hasil analisis dibandingkan untuk meyakinkan ketepatan metode analisis biosensor dibandingkan dengan metode analisis standar.

4.1.10. Penentuan Asam Urat Secara FIA

Penentuan asam urat dilakukan menggunakan biosensor elektrokimia dalam sistem FIA seperti dirangkaikan pada Gambar 4.1. Pengujian respon biosensor terhadap asam urat dilakukan dengan menggunakan larutan asam amino urat standar. Percobaan dilakukan

dengan mengikuti parameter optimum yang didapatkan pada percobaan analisis penentuan kolesterol, sedangkan optimasi parameter lain dilakukan sesuai dengan jenis enzim yang dipergunakan yang belum dioptimasi pada percobaan sebelumnya. Analisis asam urat dilakukan dengan cara menyuntikkan 50 μ l larutan standar seri ke dalam injeksi sampel, dan reaksi enzimasi diamati dengan cara pengukuran signal (potensial elektroda, *E*) menggunakan mikrokomputer. Signal selanjutnya diubah menjadi konsentrasi asam urat (mM). Selanjutnya biosensor diaplikasikan untuk penentuan asam urat di dalam sampel makanan berupa berbagai jenis daging segar, minuman berlemak, dan berbagai jenis kacang-kacangan. Analisis asam urat terhadap sampel yang sama juga dilakukan dengan menggunakan metode spektrofotometri, yaitu sebagai pembanding terhadap metode analisis yang dikembangkan.

4.1.11. Organisasi dan Analisis Data Metode FIA

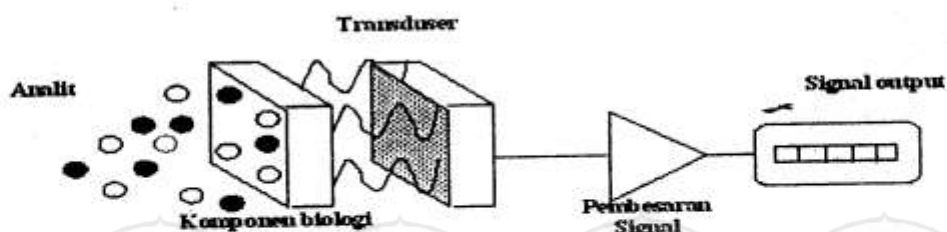
Data penelitian ini adalah merupakan hasil pengukuran kimia dan pengukuran elektrokimia. Respon biosensor terhadap analit kolesterol dan asam urat dilakukan secara potensiometri diperoleh dari hasil pengukuran berupa signal puncak FIA-gram (*E*) yang diubah menjadi skala angka (konsentrasi) berdasarkan larutan standar seri. Angka hasil pengukuran dihitung secara statistika untuk menghitung rata-rata, standar deviasi, dan dilanjutkan dengan penarikan kesimpulan menggunakan *EXCEL soft ware*. Hasil pengukuran dan pengolahan dirangkum dalam bentuk gambar signal (FIA-gram), tabel, dan grafik (kurva).

4.2. Metode Penelitian Tahap II Dalam Sistem Statik

Metode penelitian tahap ke dua untuk tahun 2007 adalah merupakan lanjutan dari metode penelitian tahap pertama tahun 2006. Metode penelitian terdiri atas rancangan penelitian, prosedur dan tahapan penelitian, optimasi biosensor, preparasi sampel untuk analisis, dan analisis sampel secara biosensor dan spektrofotometri, masing-masing dijelaskan secara terperinci berikut ini.

4.2.1. Rancangan Penelitian Tahun II Dalam Sistem Statik

Penelitian tahap II adalah berupa eksperimental murni di laboratorium. Rancangan penelitian pada pembuatan rancang bangun biosensor elektrokimia adalah biosensor tunggal dalam sistem statik terdiri atas: analit, komponen biologi, transduser terdiri atas komponen elektroda modifikasi, amplifikasi signal, dan signal prosessor pada mikrokomputer (Power Lab) seperti diperlihatkan pada Gambar 4.2.



Gambar 4.2. Rancang bangun biosensor elektrokimia dalam sistem statik yang terdiri atas: analit, komponen biologi, transduser terdiri atas komponen elektroda modifikasi, amplifikasi signal, dan signal processor pada mikrokomputer (Power Lab).

4.2.2. Prosedur dan Tahapan Penelitian Metode Statik

Prosedur pembuatan biosensor elektrokimia sebagai instrumen analisis untuk kontrol kualitas makanan dan minuman adalah melalui immobilisasi komponen biologi aktif di dalam matriks polityramin secara elektrokimia menghasilkan elektroda kerja, kemudian elektroda kerja dan elektroda referensi dimasukkan di dalam sel elektrokimia dan diintegrasikan dengan deteksi amperometri dalam sistem statik. Tahapan penelitian terdiri atas penyediaan enzim untuk immobilisasi pada matriks polityramin, pembuatan biosensor, optimasi biosensor, penyajian dan analisis data, dan preparasi sampel untuk analisis, masing-masing diringkas berikut ini.

4.2.2.1. Penyediaan Enzim Untuk Immobilisasi Enzim

Dalam pembuatan biosensor elektrokimia diperlukan bahan biologi aktif berupa enzim yang telah tersedia secara komersil (Sigma Co.) dengan aktivitas tinggi sesuai dengan yang dibutuhkan dalam penelitian. Enzim yang diperlukan untuk pembuatan biosensor asam urat adalah urikase (UOx) 50 unit/mg (E.C 1.7.3.3), dan peroksidase (POx) 175 unit/mg dari *horse radish* (E.C.1.11.1.7.2). Enzim urikase dan peroksidase yang diperlukan di dalam penelitian disediakan dengan cara melarutkan langsung enzim di dalam larutan buffer fosfat 10 mM, pH 6,0. Diperkirakan aktivitas enzim di dalam larutan tergolong tinggi, yaitu 10 U/mL UOx dan 50 U/mL POx. Selanjutnya enzim dalam bentuk larutan disimpan di dalam kulkas pada suhu 4 °C bila tidak digunakan dalam pembuatan biosensor, Berikut ini akan dijelaskan langkah pembuatan biosensor elektrokimia.

4.2.2.2. Pembuatan Biosensor Elektrokimia Sistem Statik

Biosensor elektrokimia terdiri atas elektroda kerja yang mengandung enzim di dalam matriks. Biosensor elektrokimia dibuat dengan mengintegrasikan enzim terimmobilisasi pada elektroda kerja menggunakan matriks polityramin yang dirangkai dengan deteksi

amperometri dalam sistem statik. Prosedur kerja dalam pembuatan biosensor elektrokimia adalah berturut-turut melakukan: (a) elektrodeposisi platina pada elektroda kerja, (b) membuat matriks polityramin dan immobilisasi enzim (c) mengintegrasikan instrumentasi dalam sistem statik, dan (d) optimasi biosensor menggunakan larutan standar asam urat. Masing-masing prosedur kerja dijelaskan sebagai berikut:

4.2.2.3. Elektrodeposisi Platina Pada Elektroda Kerja

Elektrodeposisi platina pada permukaan elektroda kerja karbon gelas (*glassy carbon*, GC) (BAS Inc.) dilakukan pada potensial konstan menggunakan potensiostat (BAS Inc.). Elektroda GC terlebih dahulu dibersihkan dengan menggunakan alumina $0.3 \mu\text{m}$ (BAS Inc.), lalu dibilas dengan aquades. Pembuatan larutan $2 \text{ mM K}_2\text{PtCl}_6$ dilakukan dengan cara menimbang K_2PtCl_6 dan melarutkannya di dalam HCl 10% sampai melarut kemudian mengencerkannya sehingga kadar HCl menjadi 1%, dan larutan ini disimpan di dalam wadah gelas pada suhu kamar. Selanjutnya elektrodeposisi platina pada permukaan elektroda karbon gelas dilakukan pada potensial konstan ($-0,3 \text{ V vs Ag/AgCl}$) selama 10 menit di dalam larutan $2 \text{ mM K}_2\text{PtCl}_6$ yang mengandung 1% HCl, menghasilkan elektroda karbon gelas yang mengandung platina, disebut elektroda karbon gelas terplatinesi (GC/Pt). Elektroda ini selanjutnya digunakan sebagai elektroda kerja pada pembuatan biosensor asam urat.

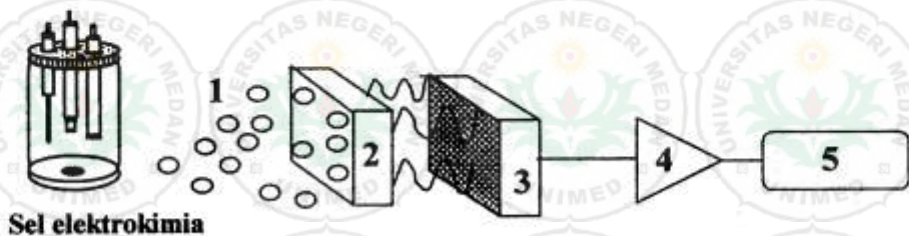
4.2.2.4. Pembuatan Matriks Polityramin Dan Immobilisasi Enzim Urikase

Matriks polimer dibuat dengan cara elektropolimerisasi monomer tyramin menjadi polimer polityramin pada permukaan elektroda GC/Pt. Elektropolimerisasi dilakukan secara voltametri siklik (CV) pada kecepatan scan $0,5 \text{ V/detik}$ pada potensial $-0,01 \text{ V}$ sampai $+1,6 \text{ V vs Ag/AgCl}$ di dalam larutan $0,1 \text{ M tyramin}$ (pH 6,0). Larutan tyramin di buat dengan cara melarutkan tyramin di dalam di dalam buffer fosfat pH 6,0 dengan mengikuti prosedur yang dikembangkan oleh peneliti (Situmorang, dkk. 2008). Monomer tyramin dan enzim dilarutkan bersama-sama di dalam larutan buffer fosfat ($0,01 \text{ M}$, pH 6,0) yang mengandung $0,01 \text{ M KCl}$ sebagai elektrolit. Elektropolimerisasi dilakukan secara siklik voltametri (CV) sebanyak 5 kali *sweep cycle*. Pada saat elektropolimerisasi, enzim menjadi terperangkap di dalam polimer (immobilisasi enzim secara fisik). Selanjutnya gugus karboksil pada enzim yang terikat pada polimer dalam proses elektrokimia kemudian disenyawakan terhadap gugus amino yang terdapat pada polityramin agar berikatan secara kovalen (*covalent attachment*) dengan menggunakan senyawa *crosslinking agent* $0,015 \text{ M}$ 1-ethyl-3(3 dimethylaminopropyl) carbodiimide

hydrochloride (EDC) dan 0,03 M N-hydroxysuccinimide (NHS), di dalam buffer fosfat (0,01M, pH 5,5) selama 1 jam, kemudian dihasilkan elektroda enzim GC/Pt/PTy/UOx atau biosensor asam urat. Selanjutnya elektroda enzim dibilas dengan larutan buffer fosfat (0,01 M, pH 6,0) untuk menghilangkan enzim yang tidak bereaksi dalam reaksi crosslink dengan ikatan kovalen, lalu disimpan di dalam lemari es (4 °C) selama satu malam. Sebelum elektroda enzim digunakan, elektroda GC/Pt/PTy/UOx harus dikondisikan terlebih dahulu dengan cara membiarkan elektroda di dalam larutan buffer fosfat (0,01 M, pH 6,0) paling sedikit selama 5 menit, kemudian elektroda kerja GC/Pt/PTy/UOx siap untuk dipergunakan untuk penentuan asam urat di dalam sampel.

4.2.2.5. Integrasi Instrumentasi Sistem Statik

Ada tiga jenis elektroda yang diperlukan di dalam biosensor asam urat yang ditempatkan di dalam sel elektrokimia, yaitu elektroda kerja GC/Pt/PTy/UOx, elektroda auxilari (lempeng Pt), dan elektroda referensi (Ag/AgCl). Tiga jenis elektroda ini selanjutnya ditempatkan dalam sel elektrokimia (seperti diperlihatkan pada insert dalam gambar 4.2). Selanjutnya sel elektrokimia dirangkai dalam disain biosensor elektrokimia dalam sistem statik dengan menggunakan deteksi elektrokimia amperometri, yang terdiri atas Disain biosensor dalam sistem statik yang terdiri atas sel elektrokimia, potentistat, amplifikasi signal, dan mikrokomputer seperti diperlihatkan pada gambar 4.3.



Gambar 4.3. Disain biosensor dalam sistem statik yang terdiri atas: (1) analit, (2) komponen biologi, (3) transduser terdiri atas komponen elektroda modifikasi (1-3 semuanya dalam sel elektrokimia), (4) amplifikasi signal, dan (5) mikrokomputer.

4.2.3. Optimasi Biosensor Asam Urat Dalam Sistem Statik

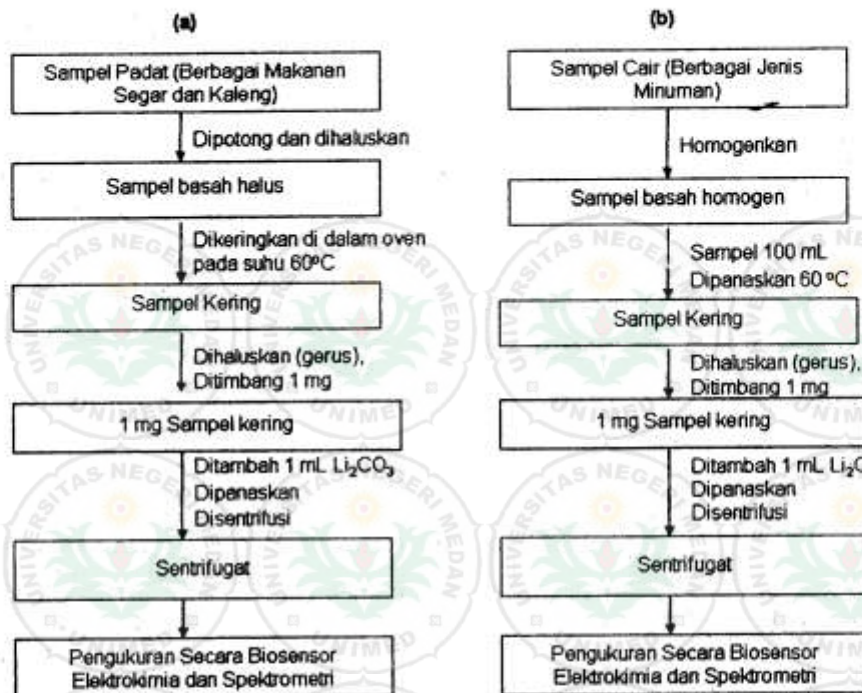
Untuk mendapatkan kondisi percobaan yang optimum dilakukan optimasi biosensor asam urat dengan menggunakan larutan standard baku asam urat dengan variasi: jenis larutan buffer, konsentrasi, dan pH. Sifat-sifat biosensor asam urat dikarakterisasi melalui uji linieritas, sensitifitas, keterulangan (reproduksibilitas), batas deteksi, stabilitas biosensor terhadap asam urat standar. Selektifitas biosensor asam urat, dan pengaruh senyawa

pengganggu (*interference*) terhadap respon elektroda kerja juga dipelajari dalam studi selektifitas biosensor asam urat. Data hasil penelitian yang diperoleh dalam mikrokomputer menggunakan software *Chart and Scope soft ware* (ADInstrument) diolah menggunakan *Microsoft Excel soft ware* dan disajikan dalam bentuk signal biosensor, gambar, tabel, dan grafik.

4.2.4. Praperlakuan Sampel Untuk Analisis Secara Biosensor

Sampel makanan dan minuman terdiri atars berbagai jenis bahan sayuran segar, bahan daging segar dan kaleng, bahan ikan segar dan kaleng, dan berbagai jenis kacang-kacangan. Sedangkan sampel minuman terdiri atas minuman berlemak seperti berbagai jenis susu yang diperjualbelikan secara komersil. Perlakuan sampel dalam bentuk padatan dilakukan sebagai berikut, yaitu masing-masing sampel terlebih dahulu dipotong-potong dan dihaluskan, kemudian ditempatkan pada kaca arloji dan dikeringkan dalam oven pada suhu $60\text{ }^{\circ}\text{C}$. Sampel yang kering selanjutnya digerus halus dan selanjutnya digunakan sebagai stok sampel. Dari sampel kering yang telah halus tersebut ditimbang sekitar 1 mg sampel dilarutkan di dalam 2 ml larutan litium karbonat 4%, diaduk dan dipanaskan dalam penangas air pada suhu $\pm 50\text{ }^{\circ}\text{C}$ selama 5 menit sampai semua asam urat yang terdapat di dalam sampel diyakinkan sudah melarut. Selanjutnya larutan sampel yang diekstrak asam uratnya didinginkan kemudian disentrifusi sehingga diperoleh sentrifugat yang siap untuk dianalisis, larutan ini disebut sebagai larutan sampel yang akan dianalisis menggunakan biosensor elektrokimia dan sebagai pembanding dianalisis secara spektrometri UV-Vis. Secara umum skema perlakuan sampel untuk analisis sampel bahan makanan dan minuman dalam bentuk padat diperlihatkan pada Gambar 4.4A.

Selanjutnya, sampel dalam bentuk cair berupa miuman dihomogenkan, kemudian sebanyak 1 ml sampel dipipet dan dimasukkan ke dalam tabung sentrifusi, kemudian ditambahkan 1 ml larutan litium karbonat 4% (pengenceran 1:1), lalu diaduk dan dipanaskan dalam penangas air pada suhu $\pm 50\text{ }^{\circ}\text{C}$ selama 5 menit sampai semua asam urat yang terdapat di dalam sampel diyakinkan sudah melarut. Selanjutnya larutan sampel yang diekstrak asam uratnya didinginkan kemudian disentrifusi sehingga diperoleh sentrifugat yang siap untuk dianalisis, larutan ini disebut sebagai larutan sampel yang akan dianalisis menggunakan biosensor elektrokimia dan dan sebagai pembanding dianalisis secara spektrometri UV-Vis. Secara umum skema perlakuan sampel untuk analisis sampel bahan makanan dan minuman dalam bentuk cair diperlihatkan pada Gambar 4.4B.

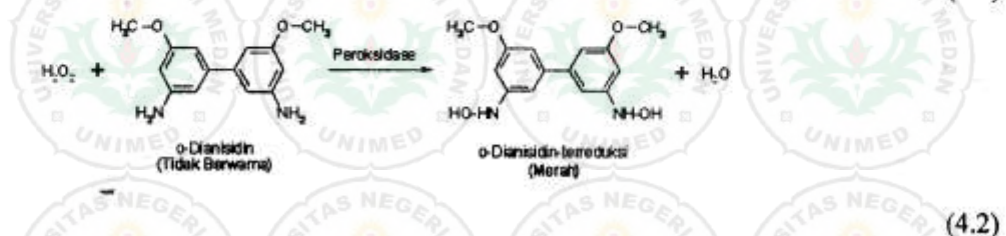
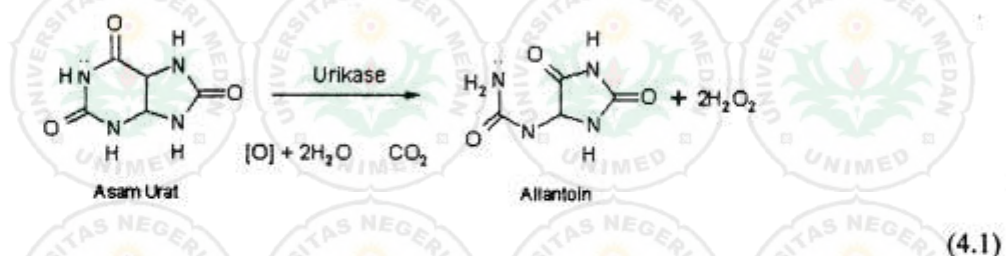


Gambar 4.4. Skema perlakuan sampel untuk analisis secara biosensor elektrokimia dan spektrofotometri untuk: (a) bahan makanan dan minuman dalam bentuk bahan padatan, dan (b) bahan makanan dan minuman dalam bentuk bahan cair.

4.2.5. Analisis Sampel Secara Biosensor dan Spektrofotometri

Sampel makanan dan minuman berupa sentrifugat yang sudah diperlakukan seperti pada Gambar 4.3 selanjutnya dianalisis secara biosensor elektrokimia secara statik. Analisis penentuan asam urat dengan biosensor elektrokimia dilakukan dengan cara mengukur larutan standar asam urat secara seri kemudian dilanjutkan dengan analisis sampel tanpa perlakuan sampel (sampel langsung disuntikkan ke dalam sel elektrokimia), dengan cara menyediakan larutan buffer fosfat 10 mL, kemudian ke dalamnya dimasukkan biosensor asam urat lalu menyuntikkan 50 μ l larutan standar secara seri dimulai pada konsentrasi yang terendah dan setelah arus konstan dilanjutkan dengan menyuntikkan larutan asam urat konsentrasi yang lebih tinggi sampai seluruh larutan satandar seri telah dianalisis. Untuk menganalisis sampel pada penentuan asam urat di dalam sampel dilakukan prosedur yang sama yaitu dengan menyuntikkan 50 μ l sampel yang sudah diekstrak ke dalam sel elektrokimia yang sudah mengandung larutan buffer fosfat 10 mL sampai diperoleh arus konstan, kemudian analisis secara berulang dilakukan pada sampel yang lain sampai diperoleh arus konstan, kemudian dibandingkan dengan larutan standar seri.

Sebagai pembanding, penentuan asam urat dilakukan analisis ampel secara spektrofotometri dengan menggunakan spektrofotometri UV-Vis sebagai berikut. Ke dalam mikropipet dimasukkan 90 μl larutan litium karbonat 4%, dilanjutkan dengan penambahan 50 μl standar asam urat, kemudian ditambahkan 5 μl enzim UOx (2 unit/mL) dan 5 μl POx (5 unit/mL) dan diaduk dan diinkubasi selama 10 menit dan dimasukkan ke dalam spektrofotometri UV-Vis absorbansi diukur pada λ 520 nm, dilakukan untuk larutan standar seri (0,01 – 5 mM asam urat). Dengan prosedur yang sama dilakukan penentuan asam urat dalam sampel dengan cara memasukkan 90 μl larutan litium karbonat 4% ke dalam mikropipet, dilanjutkan dengan penambahan 50 μl sampel makanan dan minuman yang sudah diperlakukan, kemudian ditambahkan 5 μl enzim UOx (2 unit/mL) dan 5 μl POx (5 unit/mL) selanjutnya diaduk dan diinkubasi selama 10 menit dan dimasukkan ke dalam spektrofotometri UV-Vis absorbansi diukur pada λ 520 nm. Hasil pengukuran selanjutnya dianalisis untuk mengetahui kadar asam urat dalam sampel. Prinsip dasar penentuan asam urat menggunakan spektrofotometri adalah berdasarkan reaksi enzimas yang diperlihatkan pada persamaan reaksi (4.1) dan (4.2).



Asam urat dioksidasi menjadi allantoin, karbon dioksida dan hidrogen peroksida (persamaan reaksi 4.1 atau persamaan reaksi 2.1), dan hidrogen peroksida selanjutnya akan diikat oleh senyawa pengabsorpsi yang akan menghasilkan senyawa baru berupa senyawa kompleks yang berwarna dan dapat menyerap sinar yang diukur pada panjang gelombang maksimum dengan menggunakan spektrofotometer. Dalam penelitian ini akan digunakan *o*-dianisidin sebagai senyawa pengabsorpsi, karena pengabsorpsi ini sangat baik berdasarkan daya serap sinarnya dan cepat menghasilkan senyawa baru. Senyawa *o*-dianisidin (tidak berwarna) bereaksi dengan hidrogen peroksida (yang dihasilkan dari reaksi enzimas) oleh adanya katalis enzim peroksidase (POx), menghasilkan *o*-dianisidin

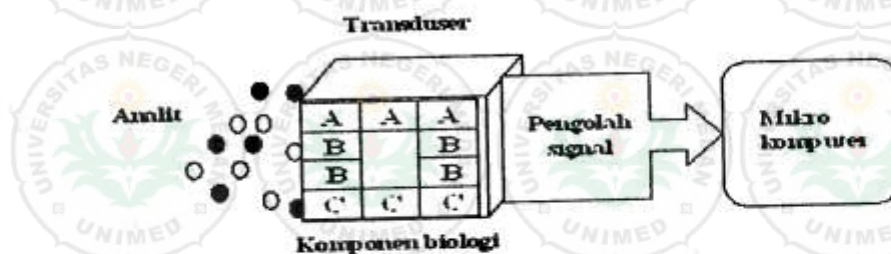
tereduksi yang berwarna merah muda pada persamaan reaksi (4.2). Intensitas warna dalam larutan berbanding lurus dengan konsentrasi asam urat dalam sampel. Pengukuran absorbansi larutan diukur pada panjang gelombang maksimum $\lambda 520\text{nm}$.

4.3. Metode Penelitian Tahun III Menggunakan Strip Biosensor

Metode penelitian tahap ke tiga rencana usulan ini terdiri atas rancangan penelitian, prosedur dan tahapan penelitian, dan rencana jadwal kerja tahun 2008 yang dijelaskan secara terperinci sebagai berikut:

4.3.1. Rancangan penelitian Tahap III Strip Biosensor

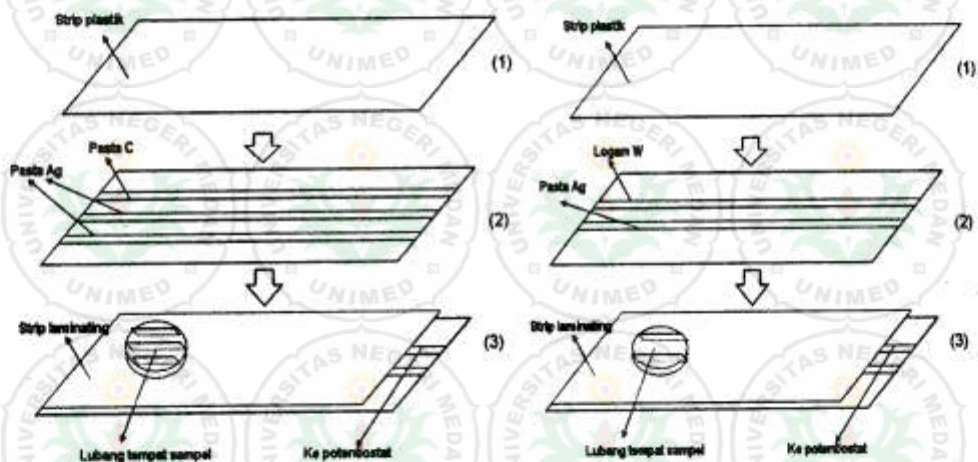
Penelitian adalah berupa eksperimental murni di laboratorium. Penelitian untuk pembuatan biosensor elektrokimia yang direncanakan dalam usulan penelitian ini terdiri atas pembuatan rancang bangun biosensor tunggal dalam sistem statik ukuran mini (miniaturasi) seperti diperlihatkan pada Gambar 4.5.



Gambar 4.5. Disain biosensor dalam bentuk strip terdiri atas analit, enzim (A-C) dalam matriks polimer, signal amplifikasi dan convertor, dan signal di dalam mikro komputer (Power Lab).

Disain biosensor mini dalam bentuk strip merupakan sel elektrokimia yang lebih sederhana dalam deteksi amperometri yang terdiri atas elektroda kerja, elektroda referensi dan elektroda auxilari yang dibuat dalam satu elektroda strip yang kompak, sederhana dan dengan ukuran kecil. Lebih lanjut deskripsi sel elektrokimia yang direncanakan di dalam penelitian ini adalah sebagai berikut. Bahan dasar elektroda direncanakan adalah polimer atau plastik yang non-konduktif yang ringan tetapi tahan terhadap asam dan basa. Elektroda kerja terdiri atas pasta karbon yang ditempelkan ke dalam bahan plastik, yang berpungsi sebagai penghubung (konduktif) terhadap potensiostat dan sekaligus sebagai pensensing (sensor). Selanjutnya bagian elektroda kerja yang akan dipergunakan sebagai pensensing (C) akan dilapis dengan platina secara elektrokimia (elektrodeposisi) sehingga terbentuk karbon terplatinasi (C/Pt). Dua elektroda lain adalah dibuat dari pasta perak sebagai auxilari (Ag) dan elektroda referensi yang dibuat dari pasta perak (Ag) yang akan dilapis menjadi perak/perak klorida (Ag/AgCl). Skematik strip biosensor dalam deteksi

amperometri yang direncanakan diperlihatkan pada Gambar 3.2a. Selanjutnya, biosensor dalam deteksi potensiometri juga akan dibuat dengan dua elektroda (W vs Ag/AgCl). Elektroda kerja dibuat dengan cara seperti pada elektroda kerja deteksi amperometri (Gambar 4.6a), tetapi yang akan dipergunakan sebagai sensing adalah wolfram (W) yang akan dilaminating, sedangkan elektroda lain adalah dibuat dari pasta perak (Ag) yang akan dilapis menjadi perak/perak klorida (Ag/AgCl) sebagai referensi. Skematik strip biosensor dalam deteksi potensiometri yang direncanakan diperlihatkan pada Gambar 4.6b.



Gambar 4.6. Skematik biosensor mini dalam bentuk strip terdiri atas elektroda kerja (pasta karbon), elektroda referensi (pasta perak yang dilapis AgCl) dan tempat sampel: (1) bahan strip plastik, (2) strip plastik dioles pasta C dan pasta Ag, (3) Strip yang ditutup plastik (laminating) yang disediakan tempat sampel dan elektroda dihubungkan dengan potentiostat. (a) Untuk deteksi amperometri, dan (b) untuk deteksi potensiometri

4.3.2. Prosedur dan Tahapan Penelitian Metode Strip

Rencana pembuatan rancang bangun biosensor elektrokimia ukuran kecil (mini) sebagai instrumen analisis untuk kontrol kualitas makanan dan minuman adalah membuat biosensor tunggal melalui immobilisasi komponen biologi aktif di dalam matriks poliramin, diintegrasikan dengan deteksi elektrokimia dalam sistem statik. Tahapan penelitian diringkas berikut ini. Penelitian pada tahun ke tiga adalah pembuatan biosensor tunggal dalam sistem statik melalui tahapan antara lain: (1) membuat strip sensor, (2) immobilisasi enzim, (3) interface biosensor, (4) optimisasi, dan (5) aplikasi biosensor. Disain biosensor dibuat dengan cara mengintegrasikan enzim urikase dalam bentuk strip sensor yang dirangkaikan dengan deteksi amperometri dan deteksi potensiometri akan dipergunakan untuk penentuan asam urat.

Langkah pembuatan strip biosensor dilakukan dengan mengikuti prosedur percobaan yang sudah berhasil pada Tahun 2006 dan tahun 2007. Elektroda kerja yang dipergunakan di dalam biosensor asam urat adalah karbon pasta yang dilapis dengan platina (C/Pt) dan selanjutnya dilapis dengan polimer polityramin. Platina dideposit pada permukaan karbon dengan cara elektrodposisi pada potensial konstan (-0,3 V vs Ag/AgCl) selama 10 menit di dalam larutan 2 mM K_2PtCl_6 yang mengandung 1% HCl, menghasilkan elektroda karbon yang mengandung platina, disebut elektroda karbon gelas terplatinasi (C/Pt). Elektroda ini selanjutnya digunakan sebagai elektroda kerja pada pembuatan biosensor asam urat, yaitu melalui immobilisasi enzim pada permukaan C/Pt.

Matriks polimer (polityramin) dibuat secara elektropolimerisasi pada permukaan elektroda pasta karbon dari monomer tiramin di dalam larutan buffer fosfat yang sudah mengandung enzim urikase. Enzim urikase terikat pada polityramin pada saat elektropolimerisasi, tetapi agar enzim terikat secara kovalen maka dilakukan langkah diimmobilisasi pada permukaan elektroda secara elektrokimia (*electrodeposition*) diikuti pengikatan secara kimia dengan ikatan kovalen (*covalent attachment*) menggunakan *crosslinking agent* 1-ethyl-3(3 dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride (EDC) dan N-hydroxysuccinimide (NHS). Selanjutnya elektroda akan dirangkaikan dengan deteksi elektrokimia amperometri dalam sistem statik.

Untuk mendapatkan kondisi percobaan optimum akan dilakukan optimisasi dengan menggunakan larutan standard baku dengan variasi jenis buffer dan pH, kondisi fisiologi (matriks), kondisi fisik dan kondisi kimia. Sifat-sifat biosensor dikarakterisasi melalui uji stabilitas dalam kondisi fisik dan kondisi kimia, mengetahui pengaruh variasi perlakuan, dan mengukur umur biosensor dalam beberapa kondisi. Selektifitas biosensor terhadap zat pengganggu (*interference*) akan dipelajari. Parameter lain akan disesuaikan dengan jenis dan sifat percobaan. Data hasil penelitian akan diolah menggunakan *EXCELL soft ware*, data akan disajikan dalam bentuk kromatogram, gambar, tabel, grafik dan model biosensor. Biosensor akan diaplikasikan untuk penentuan kadar asam urat di dalam sampel makanan dan minuman. Pada tahap ini diharapkan data yang diperoleh dari hasil penelitian sudah mencukupi untuk penulisan *draft* paper untuk publikasi di jurnal internasional dan jurnal nasional terakreditasi sekaligus tersedia data untuk aplikasi paten rancang bangun biosensor elektrokimia sebagai instrumen standar untuk kontrol kualitas makanan dan minuman, yang akan dapat diproduksi secara massal untuk kebutuhan pengguna instrumen di berbagai laboratorium industri makanan dan minuman.

BAB V

HASIL DAN PEMBAHASAN

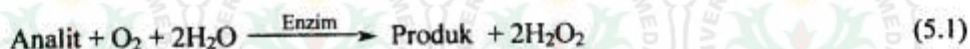
Hasil dan pembahasan yang disajikan dalam Bab ini adalah meliputi hasil penelitian tahun pertama yaitu pengembangan biosensor dalam sistem flow injeksi analisis (FIA), hasil penelitian tahun kedua yaitu pengembangan biosensor dalam sistem statik, dan hasil penelitian tahun ketiga yaitu pengembangan strip biosensor. Masing-masing hasil penelitian dan diskusinya disajikan berikut ini.

5.1. Hasil Biosensor Elektrokimia Dalam Sistem FIA

Dari hasil penelitian tahun pertama yaitu pengembangan biosensor dalam sistem flow injeksi analisis diperoleh temuan-temuan tentang pembuatan dan pengembangan biosensor dalam sistem FIA yang dapat dipergunakan dalam penentuan kolestero dan asam urat. Hasil dan temuan dijelaskan secara terintegrasi berikut ini.

5.1.1. Respon Biosensor Elektrokimia

Pengamatan terhadap respon biosensor elektrokimia terhadap analit dilakukan berdasarkan besarnya potensial yang terdapat pada sel elektrokimia yang berasal dari reaksi oksidasi analit oleh adanya reaksi enzimasi pada permukaan elektroda. Prinsip dasar reaksi enzimasi diperlihatkan pada persamaan reaksi 5.1. Analit berupa koletserol dan asam urat dioksidasi menjadi produk dan dihasilkan hidrogen peroksida yang dapat dideteksi secara potensiometri dalam flow sel dalam sistem FIA. Karena H_2O_2 yang dihasilkan dari reaksi enzimasi kolesterol atau asam urat tidak dapat dideteksi langsung secara potensiometri, maka dilakukan pendeteksian secara tidak langsung, yaitu menggunakan redoks mediator $K_3Fe(CN)_6$ untuk mereduksi H_2O_2 yang dihasilkan dari reaksi enzimasi penentuan kolesterol dalam biosensor seperti diperlihatkan dalam persamaan reaksi 5.2.



Penggunaan redoks mediator sekaligus berfungsi untuk memperbesar (amplifikasi) potensial elektroda yang terbentuk sehingga dapat dideteksi secara potensiometri. Dalam persamaan reaksi 5.2, senyawa H_2O_2 yang dihasilkan dalam reaksi oksidasi kolesterol atau asam urat direduksi oleh redoks mediator $[Fe(CN)_6]^{4-}$ menghasilkan senyawa $[Fe(CN)_6]^{3-}$, yaitu dengan kehadiran enzim peroksidase (POx) di dalam larutan sebagai katalis dalam reaksi pengubahan hidrogen peroksida, sehingga terjadi reaksi redoks seperti diperlihatkan

di dalam reaksi enzimasasi seperti pada persamaan reaksi 5.2. Potensial redoks (E) yang terjadi dari perubahan $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ dapat dideteksi secara potensiometri pada permukaan elektroda W vs Ag/AgCl. Potensial redoks yang terbentuk adalah merupakan hasil perubahan konsentrasi $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ mengikuti persamaan Nernst. Besarnya E yang terbentuk adalah setara dengan konsentrasi kolesterol di dalam sampel.

5.1.2. Optimasi Sistem FIA

Hasil reaksi enzimasasi yang ditekasi secara potensiometri dalam sistem FIA adalah berupa hidrogen peroksida (H_2O_2) dari pengubahan analit dan direduksi oleh redoks mediator seperti diperlihatkan pada persamaan reaksi 5.1 dan 5.2. Sebelum melakukan reaksi enzimasasi, maka dilakukan optimasi sistem FIA dengan menggunakan larutan standar hidrogen peroksida, terutama untuk parameter-parameter penentu untuk mendapatkan signal yang optimum, kemudian menggunakan reaksi enzimasasi untuk penentuan kolesterol dan dilanjutkan dengan penentuan asam urat. Langkah ini dilakukan untuk meyakinkan bahwa signal (potensial reaksi) yang dihasilkan dari hidrogen peroksida yang dihasilkan dalam reaksi enzimasasi adalah sama dengan signal yang diberikan oleh hidrogen peroksida standar.

Tabel 5.1. Kondisi optimum parameter percobaan biosensor elektrokimia dalam sistem FIA

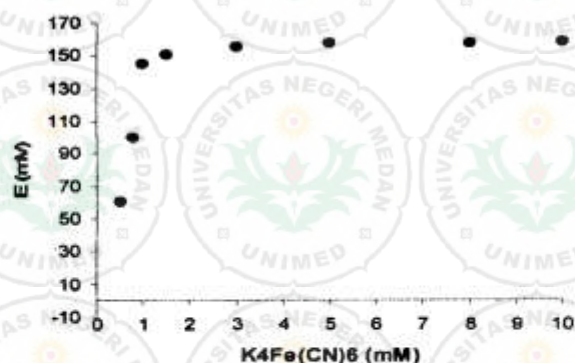
No	Parameter yang dioptimasi	Kondisi optimum sistem FIA
1	Redoks mediator ferrosianida	5 mM $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$
2	Carrier stream buffer posfat	10 mM, pH 6.0
3	Laju alir carrier stream	1,5 mL/menit
4	Volume injeksi sampel	50 μL kolesterol
5	Inkubasi Sampel	15 menit/sampel

Optimasi sistem FIA dilakukan untuk mendapatkan kondisi optimum terhadap konsentrasi redoks mediator, pH dan konsentrasi larutan buffer fosfat, volume injeksi, dan laju alir (flow rate). Parameter percobaan untuk sistem FIA dioptimasi untuk menjadikan sistem sangat sensitif terhadap H_2O_2 kemudian untuk penentuan analit (kolesterol dan asam urat). Reaksi inkubasi dilakukan dalam percobaan ini, yaitu (1) reaksi inkubasi kolesterol dengan katalisator kolesterol oksidase (COx) di dalam tabung reaksi, (2) reaksi inkubasi asam urat dengan katalisator urikase (UOx) di dalam tabung reaksi, dan (3) reaksi reduksi H_2O_2 di dalam carrier stream pada sistem FIA. Reaksi inkubasi untuk (1) dan (2) dilakukan pada waktu tertentu sebelum disuntikkan ke dalam sistem FIA. Kondisi percobaan metode

potensiometri dalam sistem FIA yang optimum untuk masing-masing parameter diringkas pada Tabel 5.1, dan hasil penjelasan beberapa parameter percobaan diberikan berikut ini.

5.1.2.1. Pengaruh Konsentrasi Redoks Mediator $K_4Fe(CN)_6$

Untuk mendapatkan respon elektroda yang optimum biosensor elektrokimia dalam sistem Flow Injeksi Analisis, salah satu parameter yang perlu dioptimasi adalah konsentrasi redoks mediator. Dalam studi ini dilakukan optimasi terhadap konsentrasi redoks mediator dengan cara membuat parameter FIA lainnya konstan. Pengaruh konsentrasi redoks mediator $K_4Fe(CN)_6$ terhadap potensial elektroda pada penentuan H_2O_2 dioptimasi dengan cara variasi konsentrasi $K_4Fe(CN)_6$ pada skala 0,5-10 mM $K_4Fe(CN)_6$. Pemilihan skala ini dilakukan dengan pertimbangan bahwa senyawa kolesterol dan asam urat yang dapat dilarutkan di dalam air adalah paling tinggi 8 mM. Hasil optimasi pengaruh redoks mediator terhadap respon FIA diperlihatkan pada Gambar 5.1.



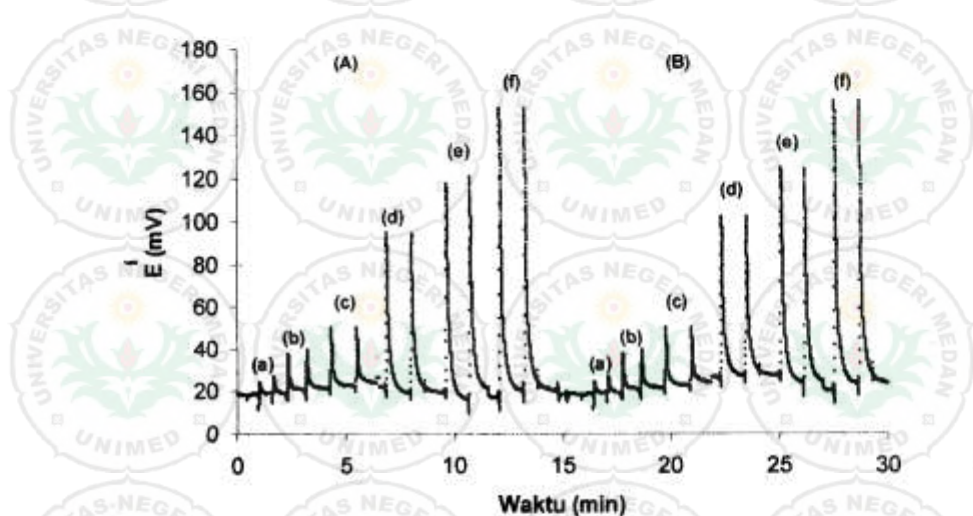
Gambar 5.1. Optimasi redoks mediator $K_4Fe(CN)_6$ dalam sistem FIA pada analisis 1 mM H_2O_2 . Optimasi dilakukan di dalam buffer fosfat pH 6,0 yang mengandung 1 unit/mL peroksidase (POx), volume injeksi 50 l, laju alir 1,5 ml/min.

Hasil optimasi yang diperlihatkan pada Gambar 5.1 menunjukkan bahwa konsentrasi redoks mediator $K_4Fe(CN)_6$ mempengaruhi terhadap respon FIA, yaitu menunjukkan reaksi yang spontan antara H_2O_2 dengan $K_4Fe(CN)_6$ di dalam larutan mengalir dengan adanya peroksidase sebagai katalis di dalam larutan. Untuk mereaksikan H_2O_2 yang disuntikkan ke dalam sistem FIA dibutuhkan redoks mediator $K_4Fe(CN)_6$ yang mencukupi, hal ini terlihat di dalam gambar 5.1 bahwa semakin rendah konsentrasi $K_4Fe(CN)_6$ di dalam larutan buffer maka potensial elektroda juga semakin rendah sampai pada konsentrasi 1 mM, dan selanjutnya dengan meningkatnya konsentrasi $K_4Fe(CN)_6$ sampai 10 mM tidak meningkatkan potensial sebagai pertanda bahwa H_2O_2 bereaksi dengan redoks mediator $K_4Fe(CN)_6$ secara stoikiometrik.

5.1.2.2. Respon FIA terhadap Analit

Tahapan penelitian untuk mengetahui kemampuan rancang bangun biosensor elektrokimia dalam sistem FIA sebagai instrumen analisis maka sistem elektrokimia yang sudah dirangkai terlebih dahulu diuji responnya terhadap analit. Respon biosensor elektrokimia dalam sistem FIA terhadap analit dilakukan untuk mengetahui apakah biosensor memberikan respon yang sama pada penentuan H_2O_2 standar dan terhadap analit (kolesterol dan asam) dalam reaksi enzimasi. Pengujian respon biosensor dilakukan dengan menggunakan larutan standar H_2O_2 dan kolesterol seperti diperlihatkan pada Gambar 5.2.

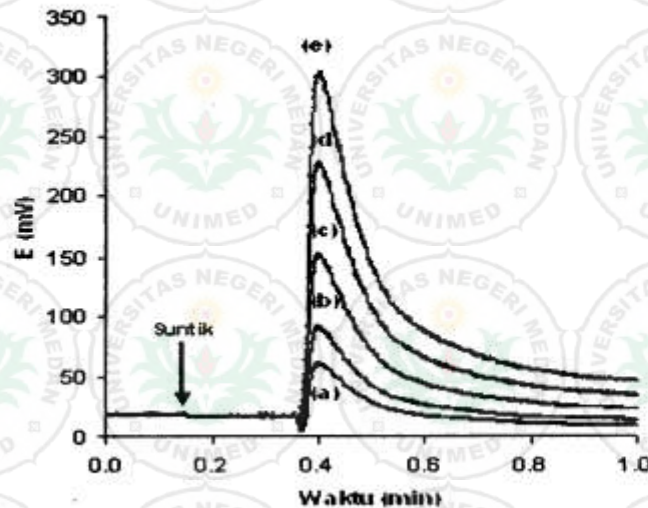
Dari hasil pada Gambar 5.2 diketahui bahwa elektrokimia dalam sistem FIA memberikan respon yang baik terhadap H_2O_2 dan kolesterol. FIA-gram yang diperlihatkan pada Gambar 5.2A diperlihatkan bahwa meningkatnya konsentrasi hidrogen peroksida yang disuntikkan ke dalam sistem FIA menunjukkan peningkatan potensial elektroda. Respon yang hampir sama juga dihasilkan apabila dilakukan reaksi enzimasi penentuan kolesterol seperti ditunjukkan pada Gambar 5.2B. Hasil ini meyakinkan bahwa deteksi elektrokimia secara potensiometri adalah mengikuti persamaan reaksi 5.1-5.2, yaitu konsentrasi analit adalah setara dengan potensial elektroda yang dihasilkan dalam sistem FIA. Untuk mendapatkan respon FIA yang optimum maka dilakukan optimasi terhadap sistem FIA, diantaranya volume injeksi dan laju alir.



Gambar 5.2. Respon biosensor terhadap larutan standar (A) H_2O_2 dan (B) kolesterol pada konsentrasi (a) 0,005 mM, (b) 0,01 mM, (c) 0,1 mM, (d) 0,3 mM, (e) 0,5 mM, (f) 1,0 mM, menggunakan redoks mediator $K_4Fe(CN)_6$ dalam buffer fosfat pH 6,0 yang mengandung 1 unit/mL peroksidase (POx), Volume injeksi 50 μ l, laju alir 1,5 ml/min

5.1.2.3. Pengaruh Volume injeksi

Untuk mendapatkan respon elektroda yang optimum dalam sistem Flow Injeksi Analisis, salah satu parameter yang perlu dioptimasi adalah volume injeksi. Volume injeksi optimum dipilih terutama untuk efisiensi penganalisisan. Dalam studi ini dilakukan optimasi terhadap volume injeksi dengan cara membuat parameter FIA konstan, tetapi injeksi volume divariasikan. Pengaruh volume injeksi terhadap respon biosensor pada penentuan H_2O_2 diperlihatkan pada Gambar 5.3. Dari hasil ini terlihat bahwa dengan menginjeksi $10\ \mu\text{l}$ - $150\ \mu\text{l}$ $0,1\ \text{M}$ H_2O_2 terlihat bahwa meningkatkan volume injeksi akan meningkatkan sensitivitas respon (signal) FIA. Untuk menjadikan penganalisisan menjadi lebih akurat maka dipilih volume injeksi yang konstan untuk penyuntikan larutan standar dan sampel, yaitu dipilih volume injeksi $50\ \mu\text{l}$. Pemilihan volume injeksi yang rendah juga untuk efisiensi analisis karena reaksi enzimas di dalam biosensor dilakukan dalam volume rendah (sekitar $100\ \mu\text{l}$)

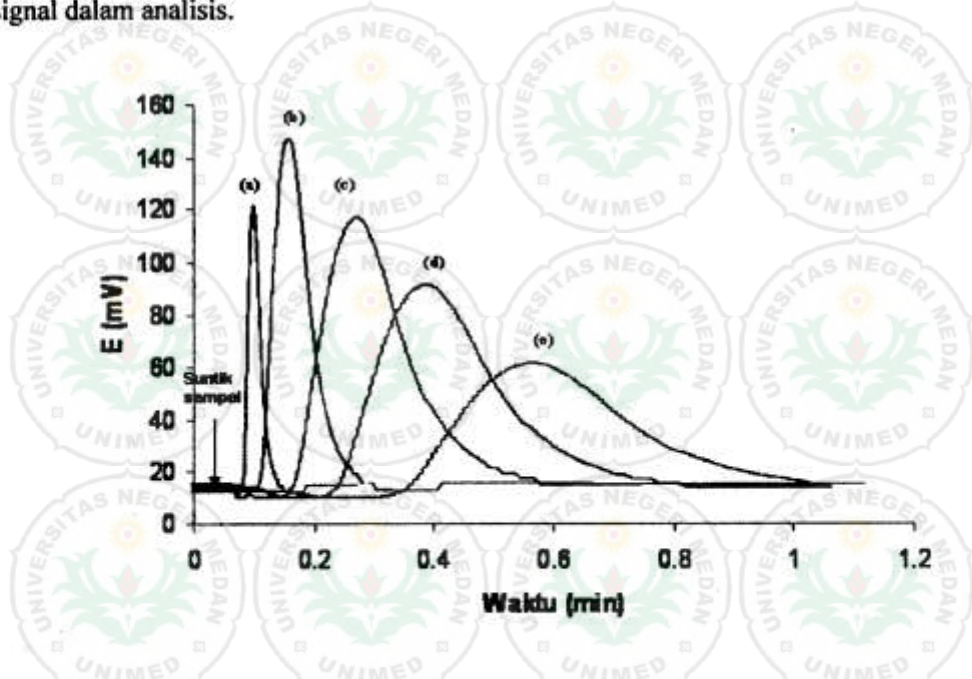


Gambar 5.3. Respon biosensor elektrokimia dalam sistem FIA pada penentuan H_2O_2 dengan penyuntikan $1\ \text{mM}$ H_2O_2 pada volume injeksi bervariasi. (a) $10\ \mu\text{l}$; (b) $30\ \mu\text{l}$; (c) 50 ; (d) 75 ; (e) 100 ; dan (f) $150\ \mu\text{l}$. Kondisi percobaan: menggunakan $5\ \text{mM}$ $K_4Fe(CN)_6$ dalam buffer fosfat pH $6,0$ yang mengandung $1\ \text{unit/mL}$ Peroksidase (POx): Volume injeksi $50\ \mu\text{l}$, laju alir $1,5\ \text{ml/min}$.

5.1.2.4. Pengaruh Laju Alir

Dalam rancang bangun flow injeksi analisis biasanya digunakan pipa pengaduk pada panjang yang konstan ($12,5\ \text{cm}$) yang berguna untuk mengaduk larutan analit dengan carrier stream dalam proses analisis, yang diukur berdasarkan laju alir. Untuk melakukan reaksi enzimas maka dilakukan variasi laju alir untuk mempercepat atau memperlambat

analit yang direaksikan sampai kepada detektor. Variasi laju alir yang diperlukan untuk memberikan waktu yang cukup dalam reaksi antara analit dan redoks mediator sehingga menghasilkan reaksi yang optimum dalam pendeteksian. Variasi laju alir juga diperlukan untuk mendapatkan bentuk FIA-gram yang baik. Dengan demikian, optimasi terhadap kecepatan laju alir harus dilakukan untuk mendapatkan bentuk FIA-gram yang lebih simetris dan lebih sensitif terhadap penentuan analit. Pengaruh variasi laju alir terhadap respon biosensor FIA pada penentuan H_2O_2 diperlihatkan pada Gambar 5.4. Dari hasil penelitian diketahui bahwa menggunakan laju alir 1,5 ml/min terlihat bahwa bentuk FIA-gram sangat simetris dan sensitif, juga diikuti dengan meningkatnya kecepatan munculnya signal dalam analisis.



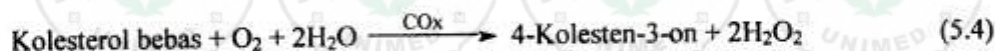
Gambar 5.4. Respon biosensor elektrokimia dalam sistem FIA pada penentuan H_2O_2 dengan penyuntikan 1 mM H_2O_2 pada volume injeksi 50 μ l. Kondisi percobaan: menggunakan 5 mM $K_4Fe(CN)_6$ dalam buffer fosfat pH 6,0 yang mengandung 1 unit/mL Peroksidase (POx): Laju alir: (a) 2,0 ml/min, (b) 1,5 ml/min, (c) 1,2 ml/min, (d) 1,0 ml/min, dan (e) 0,8 ml/min.

Penambahan laju alir menjadi 2,0 ml/min (Gambar 5.4a) menurunkan sensitivitas penganalisisan dibandingkan dengan menggunakan laju alir 1,5 ml/min (Gambar 5.4b). Menurunnya sensitivitas penganalisisan ini adalah disebabkan semakin rendah waktu yang tersedia dalam reaksi inkubasi antara analit dengan redoks mediator di dalam flow sel, sehingga potensial yang dihasilkan menjadi lebih rendah. Akan tetapi, bila dilanjutkan memperlambat laju alir menjadi 1,2 ml/min ternyata tidak meningkatkan sensitivitas penganalisisan (Gambar 5.4c), dan diikuti dengan melebarnya bentuk FIA-gram yang

dihasilkan. Respon FIA yang lebih rendah dan bentuk FIA-gram yang lebih lebar juga dihasilkan apabila laju alir diperlambat menjadi 1,0 ml/min (Gambar 5.4d), dan menunjukkan pola penurunan potensial dan melebarnya signal FIA bila laju alir semakin kecil 0,8 ml/min (Gambar 5.4e), dan di samping itu waktu yang dibutuhkan untuk mendapatkan respon elektroda juga semakin lama (analisis bertambah lambat). Dari hasil ini, untuk pertimbangan antara sensitivitas pengukuran dengan kecepatan analisis maka dipilih laju alir pada 1,5 ml/min.

5.1.3. Biosensor FIA Penentuan Kolesterol

Prinsip dasar biosensor penentuan kolesterol reaksi enzimasi digambarkan pada persamaan reaksi 5.3-5.4, yaitu berdasarkan reaksi katalisis kolesterol ester menjadi kolesterol bebas dan asam lemak oleh kehadiran enzim kolesterol esterase (CE) (Reaksi 5.3). Selanjutnya kolesterol dioksidasi menjadi kolestenon dan hidrogen peroksida (H_2O_2) oleh kehadiran enzim kolesterol oksidase (COx) (Reaksi 5.4), kemudian H_2O_2 yang dihasilkan bereaksi dengan ferosianida menghasilkan ferisianida oleh kehadiran enzim peroksidase (POx) (Reaksi 5.2).

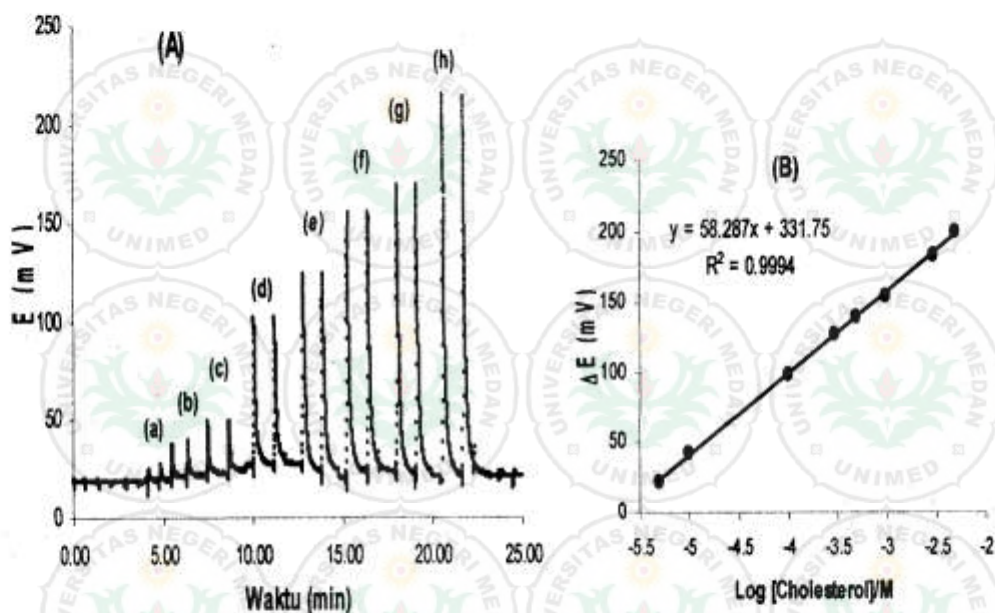


Perubahan ferosianida menjadi ferisianida dideteksi secara potensiometri dalam sistem FIA. Potensial redoks dideteksi di dalam sel elektrokimia menggunakan elektroda W vs Ag/AgCl, yaitu potensial yang terbentuk secara stoikhiometri setara dengan konsentrasi kolesterol di dalam sampel.

5.1.3.1. Respon FIA Terhadap Kolesterol

Biosensor dalam sistem FIA memberikan respon yang sensitif terhadap kolesterol. Bentuk FIA-gram penentuan kolesterol diperlihatkan pada Gambar 5.5. Potensial yang terbentuk, yaitu berdasarkan pengukuran puncak FIA-gram diplot terhadap waktu. Puncak FIA-gram meningkat secara linier terhadap konsentrasi kolesterol sampel yang disuntikkan. Respon FIA terhadap kolesterol sangat cepat, yaitu dua menit per-sampel, sudah termasuk waktu yang diperlukan antara penyuntikan satu sampel dengan sampel yang lain (interval). Dengan demikian, dalam keadaan normal biosensor mampu menganalisis kolesterol sebanyak 20 sampel per-jam. Kurva kalibrasi larutan kolesterol standar diperlihatkan pada Gambar 5.5B. Linieritas pengukuran berada pada skala konsentrasi 0,005 – 5,0 mM kolesterol, slope 58,29 mV/perdekade konsentrasi kolesterol. Lebarnya linieritas

pengukuran yang mencakup konsentrasi rendah sampai tinggi sangat menguntungkan untuk penentuan kolesterol, karena sudah dapat mencakup kadar kolesterol rendah dan tinggi yang terdapat pada sampel.



Gambar 5.5. (A) Bentuk FIA-gram untuk: (a) 0,005 mM, (b) 0,01 mM, (c) 0,1 mM, (d) 0,3 mM, (e) 0,5 mM, (f) 1,0 mM, (g) 3,0 mM, (h), dan 5,0 mM kolesterol standar; (B) Kurva kalibrasi larutan kolesterol standar merupakan rata-rata 3 ulangan. Kondisi percobaan: menggunakan 5 mM $K_4Fe(CN)_6$ dalam buffer fosfat pH 6,0 yang mengandung 1 unit/ml Peroksidase (POx); Volume injeksi 50 μ l, laju alir 1,5 ml/min.

Biosensor yang dikembangkan dalam penelitian ini mempunyai kemampuan analisis lebih sensitif dan skala linearitas pendeteksian lebih lebar bila dibandingkan dengan deteksi yang dilakukan pada penelitian sebelumnya (Situmorang, dkk. 1997). Biosensor sangat sensitif terhadap kolesterol yaitu dapat menentukan kolesterol konsentrasi sangat rendah, dengan deteksi batas 0,001 mM kolesterol. Karena kadar total kolesterol di dalam makanan bervariasi, yaitu berada pada skala konsentrasi 1,8-8 mM (Krug, dkk., 1992), maka beberapa sampel dapat dianalisis tanpa pengenceran, kecuali pada sampel yang mempunyai kadar kolesterol sangat tinggi (>7 mM kolesterol) harus membutuhkan pengenceran. Karena kolesterol sukar larut di dalam air, maka masih dibutuhkan perlakuan sampel dengan cara melarutkan sampel di dalam larutan pengemulsi 1% triton X-100 dan 1% isopropanol yang tidak mengganggu reaksi enzimas, sehingga reaksi redoks dapat berlangsung sempurna. Dari uji aktifitas enzim dan reaksi redoks diketahui bahwa kehadiran pengemulsi 1% triton

X-100 dan 1% isopropanol tidak mempengaruhi aktifitas enzim dan deteksi potensiometri di dalam sel elektrokimia.

5.1.3.2. Selektifitas Biosensor FIA Penentuan Kolesterol

Untuk mengetahui selektifitas biosensor elektrokimia dalam sistem FIA untuk penentuan kolesterol telah dilakukan studi interferen dengan menggunakan larutan standar baku. Respon biosensor terhadap senyawa-senyawa pengganggu yang diduga ada di dalam sampel makanan dan minuman dipelajari. Ke dalam sistem FIA disuntikkan berturut-turut sebanyak 50 μ l larutan standar 1 mM kolesterol yang sudah diinkubasi dan dilanjutkan dengan penyuntikan senyawa pengganggu 1 mM secara terpisah, kemudian mencampurkan interferen dengan kolesterol standar (1 mM interferen + 1 mM kolesterol) kemudian diinkubasi dan dianalisis menggunakan sistem FIA, hasil pengukuran potensial dirangkum pada Tabel 5.2.

Tabel 5.2. Respon urea terhadap 1 mM kolesterol dengan dengan kehadiran 1 mM senyawa interferen yang dianggap sebagai interferen. Angka dalam tabel adalah selisih antara potensial elektroda terhadap potensial dasar larutan buffer.

No	Jenis interferen	Pengukuran, (ΔE , mV)		Selisih**
		Keadaan murni*	Campuran*	
1	Kolesterol 1 mM	133.4(\pm 1.3)	133.4(\pm 1.5)	0.0
2	Asam urat 1 mM	10.2(\pm 1.6)	134.7(\pm 1.3)	1.3
2	Asam amino 1 mM	16.3(\pm 2.3)	135.2(\pm 2.0)	1.8
3	Urea 1 mM	6.1(\pm 1.8)	134.1(\pm 1.1)	0.7
4	Asam oksalat 1 mM	17.3(\pm 1.4)	135.6(\pm 0.9)	2.2
5	Parasetamol 1 mM	18.1(\pm 2.4)	135.2(\pm 1.3)	1.8
5	Glukosa 1 mM	7.4(\pm 0.5)	133.5(\pm 0.7)	0.1
6	Fruktosa 1 mM	5.6(\pm 0.7)	133.5(\pm 0.8)	0.1
7	Asam askorbat 1 mM	17.3(\pm 1.5)	136.7(\pm 1.2)	3.3

*Rata-rata 3 pengukuran dan standar deviasi

**Selisih adalah perbedaan potensial antara 1 mM kolesterol dengan 1 mM senyawa interferen yang ditambahkan ke dalam 1 mM kolesterol

Dari data pengukuran yang ditunjukkan pada Tabel 5.2 terlihat bahwa penyuntikan senyawa pengganggu (interferen) ke dalam larutan buffer pada konsentrasi 5 mM memberikan perubahan potensial yang relatif kecil. Semua senyawa yang dianalisis menghasilkan potensial, yaitu potensial yang berasal dari konsentrasi analit yang tinggi dan juga perubahan kondisi pH larutan dengan penambahan asam dan garam. Hal ini

dibuktikan dengan percobaan bila penambahan senyawa intrferen dalam konsentrasi kecil (0,1 mM atau lebih rendah) ternyata tidak terlihat perubahan potensial yang signifikan terhadap potensial dasar untuk larutan buffer. Akan tetapi, pada saat senyawa interferen (1 mM) dicampurkan ke dalam 1 mM kolesterol terlihat bahwa respon biosensor didominasi oleh potensial yang berasal dari reaksi enzimasi perubahan kolesterol. Kehadiran senyawa interferen, walau sudah berada pada konsentrasi tinggi, ternyata tidak banyak mengubah potensial elektroda pada penganalisisan 1 mM kolesterol. Hasil ini menunjukkan bahwa biosensor elektrokimia dalam sistem FIA untuk penentuan kolesterol yang dikembangkan dalam penelitian ini memiliki selektifitas yang cukup tinggi terhadap kolesterol. Biosensor dalam sistem FIA memberikan hasil pengukuran yang akurat dan relatif tidak dipengaruhi oleh hadirnya senyawa interferen pada konsentrasi normal di dalam sampel. Dengan demikian, biosensor elektrokimia dalam sistem FIA dapat diaplikasikan untuk penentuan kolesterol di dalam sampel makanan dan minuman.

5.1.3.3. Penentuan Kolesterol Dalam Makanan dan Minuman Secara FIA

Biosensor elektrokimia dalam sistem FIA diaplikasikan untuk penentuan kolesterol dalam berbagai jenis makanan seperti pada sampel daging segar, daging kaleng, dan minuman kaleng berlemak. Penganalisisan sampel dilakukan dengan menggunakan metode biosensor dan metode spektrofotometri dengan menggunakan reaksi enzimasi. Hasil pengukuran terhadap kadar kolesterol di dalam sampel dirangkum pada Tabel 5.3. Penentuan kolesterol di dalam sampel menggunakan biosensor menunjukkan hasil yang baik, yaitu temuan kadar kolesterol di dalam sampel hampir sama dengan kadar kolesterol di dalam sampel menggunakan metode spektrofotometri adalah berada pada 80-125%. Hasil analisis menggunakan biosensor sistem FIA kebanyakan sedikit lebih tinggi di banding dengan metode standar, hal ini mungkin disebabkan oleh keakuratan metode biosensor lebih baik dibanding metode spektrofotometri.

Untuk meyakinkan apakah analisis penentuan kolesterol dalam sampel dengan menggunakan metode biosensor sistem FIA memiliki kesamaan dengan analisis kolesterol menggunakan metode spektrofotometri maka dilakukan perbandingan hasil analisis kedua metode analisis seperti diperlihatkan pada Gambar 5.6. Hasil analisis dari dua jenis metode analisis mempunyai hasil yang hampir sama, yaitu ditunjukkan dari koefisien koerlasi $R^2 = 0,956$. Dapat dinyatakan bahwa metode analisis biosensor elektrokimia dalam sistem FIA dapat dipergunakan untuk penentuan asam urat di dalam sampel makan dan minuman. Metode anailis yang dikembangkan dalam penelitian ini memiliki beberapa kelebihan bila dibandingkan dengan metode analisis lain seperti metode standar spektrofotometri.

Tabel 5.3. Kadar kolesterol di dalam sampel daging segar, daging kaleng dan minuman berlemak secara Biosensor FIA dan Spektrofotometri (mM/l gram sampel). Angka merupakan hasil rata-rata dari 2 kali pengukuran).

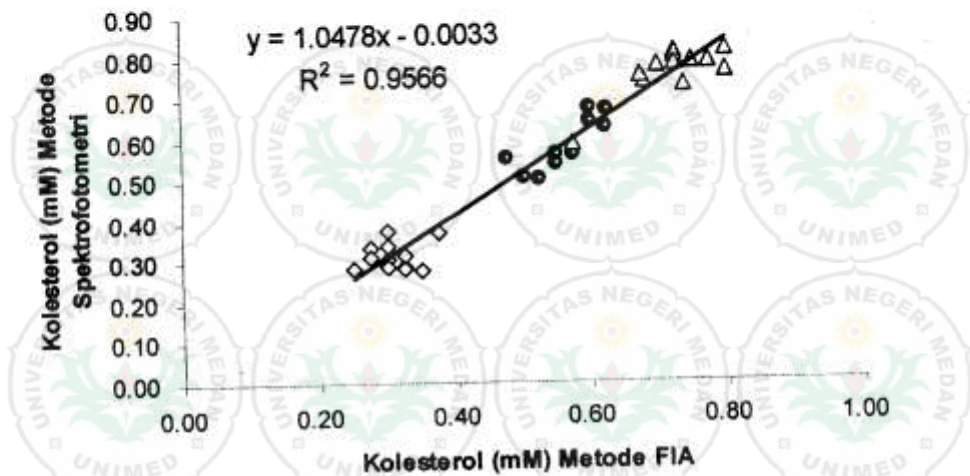
No	Kode Sampel	Metode Analisis Biosensor FIA (mM)	Metode Analisis spektrofotometri (Mm)	Temuan Biosensor (%)*
1	A1	0.30	0.31	98
2	A2	0.33	0.29	113
3	A3	0.28	0.34	82
4	A4	0.25	0.28	88
5	A5	0.28	0.31	89
6	A6	0.35	0.28	125
7	A7	0.33	0.32	103
8	A8	0.30	0.29	104
9	A9	0.30	0.34	89
10	A10	0.33	0.29	114
11	A11	0.38	0.37	101
12	A12	0.30	0.38	80
13	B1	0.53	0.50	105
14	B2	0.55	0.56	98
15	B3	0.50	0.51	99
16	B4	0.48	0.55	86
17	B5	0.55	0.54	102
18	B6	0.60	0.68	89
19	B7	0.63	0.67	93
20	B8	0.55	0.54	102
21	B9	0.60	0.64	93
22	B10	0.58	0.56	103
23	B11	0.48	0.55	86
24	B12	0.62	0.63	99
25	C1	0.73	0.81	90
26	C2	0.75	0.78	96
27	C3	0.80	0.81	98
28	C4	0.74	0.73	101
29	C5	0.70	0.78	90
30	C6	0.73	0.80	91
31	C7	0.58	0.59	97
32	C8	0.68	0.74	92
33	C9	0.68	0.75	90
34	C10	0.78	0.79	99
35	C11	0.80	0.76	105
36	C12	0.73	0.78	93

A = Daging segar B = Daging kaleng D = Minuman kaleng

*Temuan dihitung berdasarkan perbandingan hasil biosensor terhadap spektrometri

Dari hasil yang disajikan pada Tabel 5.3 diketahui bahwa kadar kolesterol di dalam sampel berturut-turut pada sampel daging segar (0,25-0,35 mM/g sampel), daging kaleng (0,50-0,60 mM/g sampel), dan minuman kaleng berlemak (0,58-0,80 mM). Metode analisis biosensor memiliki sensitifitas yang cukup tinggi, yaitu dapat menentukan kolesterol di dalam sampel pada konsentrasi rendah, yaitu pada konsentrasi 0,1 mM kolesterol. Metode

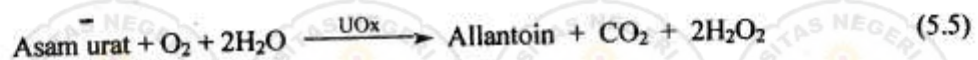
analisis mempunyai kecepatan analisis tinggi, yaitu hanya membutuhkan 1 menit untuk menentukan kadar kolesterol di dalam satu sampel, dengan langkah analisis yang sederhana.



Gambar 5.6. Hasil analisis kadar kolesterol di dalam makanan berlemak ditentukan secara Biosensor elektrokimia dalam sistem FIA dan metode standar Spektrofotometri secara reaksi enzimasi: (□) daging segar, (●) daging kaleng, dan (Δ) minuman kaleng berlemak.

5.1.4. Biosensor Penentuan Asam Urat Secara FIA

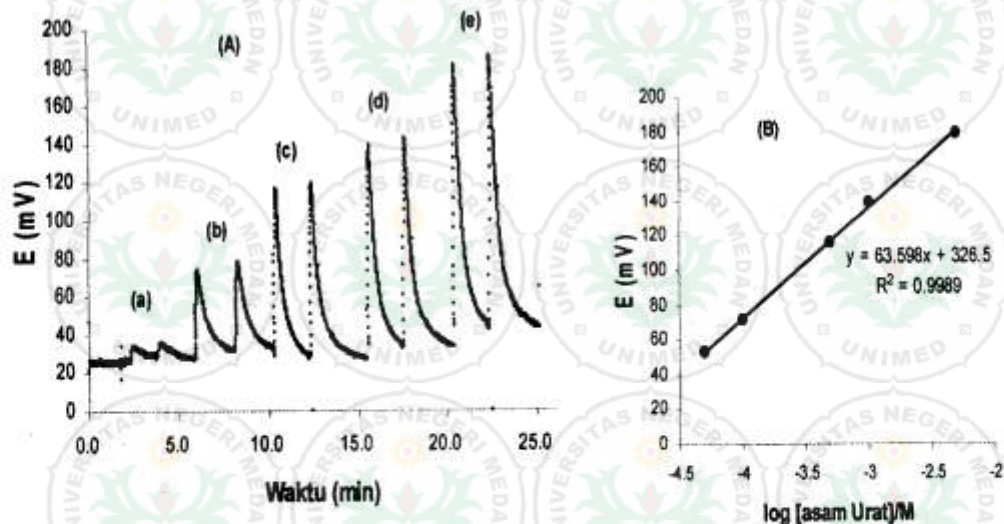
Prinsip dasar penentuan asam urat menggunakan biosensor adalah berdasarkan reaksi enzimasi seperti diperlihatkan pada persamaan reaksi (5.5). Dengan kehadiran enzim uricase (EC 1.7.3.3), asam urat dioksidasi menjadi allantoin, karbon monoksida dan hidrogen peroksida.



Hidrogen peroksida H_2O_2 yang dihasilkan dalam reaksi enzimasi selanjutnya akan bereaksi dengan redoks mediator ferisianida menghasilkan ferisianida oleh kehadiran enzim peroksidase (POx) seperti diilustrasikan pada persamaan reaksi (5.2). Perubahan ferisianida menjadi ferisianida dideteksi secara potensiometri oleh elektroda kerja dan referensi yang ditempatkan di dalam flow sel dalam sistem FIA. Selanjutnya, potensial redoks yang terbentuk dari hasil reaksi pengubahan ferisianida menjadi ferisianida dideteksi di dalam sel elektrokimia menggunakan elektroda W vs Ag/AgCl, yaitu potensial yang terbentuk pada persamaan reaksi (5.2), secara stoikhiometri adalah setara dengan konsentrasi asam urat di dalam sampel (Reaksi 5.5).

5.1.4.1. Respon Biosensor Terhadap Asam Urat

Dengan menggunakan prinsip yang sama seperti pada pengembangan biosensor kolesterol, maka pengembangan biosensor asam urat dalam sistem FIA dilakukan dengan mengintegrasikan enzim urikase untuk mengubah asam urat menjadi senyawa allantoin dan H_2O_2 yang dideteksi secara tidak langsung secara potensiometri dalam sistem FIA. Biosensor elektrokimia memberikan respon yang sensitif terhadap asam urat. Respon biosensor elektrokimia dalam sistem FIA untuk penentuan asam urat menunjukkan tahapan yang menggembirakan. Bentuk FIA-gram penentuan asam urat, merupakan potensial yang terbentuk, yaitu berdasarkan pengukuran puncak FIA-gram diplot terhadap waktu diperlihatkan pada Gambar 5.7.



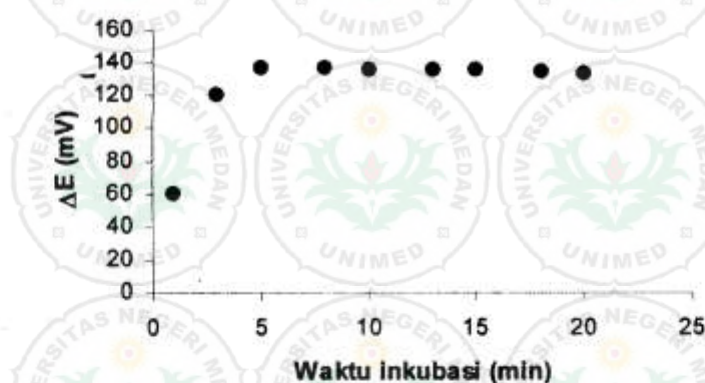
Gambar 5.7. (A) Bentuk FIA-gram untuk analisis asam urat dengan menggunakan biosensor asam urat: (a) 0,05 mM, (b) 0,1 mM, (c) 0,5 mM, (d) 1 mM, (e) 5 mM asam urat standar; (B) Kurva kalibrasi larutan asam urat standar merupakan rata-rata 3 ulangan. Kondisi percobaan: menggunakan 5 mM $K_4Fe(CN)_6$ dalam buffer fosfat pH 6,0, 1 unit/ml POx, volume injeksi 50 μ l, laju alir 1,5 ml/min.

FIA-gram yang diperlihatkan pada Gambar 5.7 menunjukkan bahwa besarnya potensial elektroda yang dihasilkan dalam reaksi enzimasi adalah setara dengan konsentrasi asam urat yang disuntikkan ke dalam sistem FIA. Semakin tinggi konsentrasi asam urat yang disuntikkan ke dalam sistem FIA maka respon FIA-gram juga akan semakin tinggi setara dengan potensial elektroda yang terbentuk dalam sel elektrokimia. Kurva kalibrasi larutan asam urat standar diperlihatkan pada Gambar 5.7B. Linieritas pengukuran berada pada skala konsentrasi 0,05 – 5,0 mM asam urat, slope 63,59 mV/perdekade konsentrasi

asam urat. Linieritas pengukuran yang mencakup konsentrasi rendah sampai tinggi sangat menguntungkan untuk penentuan asam urat, karena sudah dapat mencakup kadar asam urat rendah dan tinggi yang terdapat pada sampel. Batas deteksi biosensor masih pada skala 0,05 mM asam urat, sementara banyak sampel makanan dan minuman yang kemungkinan mengandung asam urat pada konsentrasi di bawah 0,05 mM asam urat. Untuk itu, studi lebih lanjut harus dilakukan untuk meningkatkan sensitifitas biosensor agar dapat mendeteksi asam urat pada konsentrasi sangat rendah, misalnya 0,001 mM asam urat.

5.1.4.2. Waktu Inkubasi Enzim Urikase

Penentuan asam urat dalam sampel secara potensiometri dalam sistem FIA melibatkan reaksi enzimas. Penggunaan enzim membuat metode ini menjadi lebih sensitif dan selektif terhadap asam urat dalam sampel. Enzim yang digunakan ada dua yaitu, (1) enzim urikase yang berperan dalam pengubahan asam urat menjadi allantoin dan hidrogen peroksida (Reaksi 5.5), dan (2) enzim peroksidase yang berfungsi sebagai katalis dalam reaksi reduksi hidrogen peroksida oleh redoks mediator ferosianida (Reaksi 5.2). Agar respon elektroda terhadap asam urat semakin sensitif, maka dilakukan optimasi waktu inkubasi enzim dengan asam urat untuk melihat waktu yang sangat baik untuk terjadinya reaksi enzimas secara sempurna. Optimasi dilakukan dengan mereaksikan standar asam urat 1 mM dengan enzim urikase dan peroksidase dengan variasi waktu 1-20 menit. Setelah reaksi berlangsung selama waktu yang ditentukan, hasil reaksi sebanyak 50 μ L disuntikan kedalam larutan carrier stream buffer posfat (1 mM, pH 6,0) yang mengandung redoks mediator 5 mM $K_4Fe(CN)_6$ dengan laju alir 1,5 ml/menit.

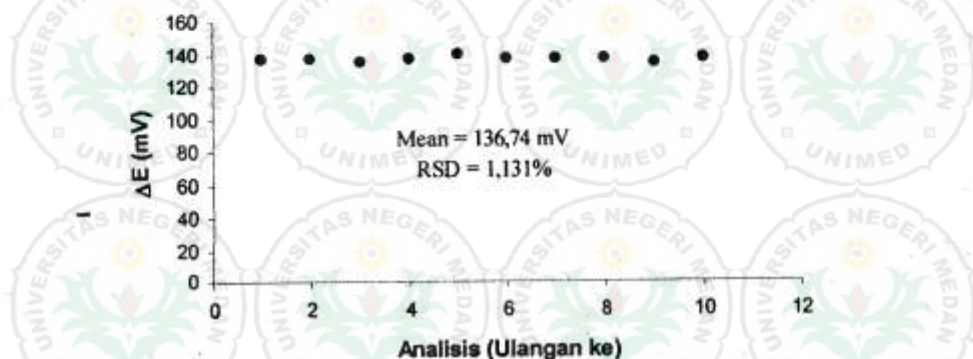


Gambar 5.8. Respon FIA untuk analisis 1 mM asam urat Kondisi percobaan menggunakan 5 mM $K_4Fe(CN)_6$ dalam buffer fosfat pH 6,0, 1 unit/ml peroksidase (POx), volume injeksi 50 μ L, laju alir 1,5 ml/min.

Hasil pengukuran reaksi inkubasi diperlihatkan pada Gambar 5.8. Dari hasil pengukuran potensial diperoleh bahwa reaksi enzimas yang berlangsung selama 5 menit memberikan respon elektroda yang sangat baik dengan harga potensial yang sudah optimum. Pertambahan waktu enzimas di atas 5 menit tidak menaikkan harga potensial elektroda. Cepatnya waktu yang dibutuhkan untuk terjadinya reaksi enzimas yang sempurna dipengaruhi oleh aktifitas enzim urikase dan peroksidase yang digunakan tinggi, sehingga reaksi berlangsung cepat. Dengan demikian waktu yang digunakan untuk inkubasi enzim selanjutnya dalam penentuan asam urat adalah 5 menit per sampel.

5.1.4.3. Studi Keterulangan Instrumen FIA Penentuan Asam Urat

Setelah diperoleh kondisi optimum untuk beberapa parameter yang dilakukan, maka metode sudah dapat digunakan untuk menentukan asam urat dalam sampel. Sebelum melakukan analisa terhadap sampel, terlebih dahulu dilakukan percobaan untuk melihat apakah instrumen FIA sudah benar-benar bisa digunakan. Hal ini dilakukan dengan menyuntikkan standar asam urat 1 mM yang telah dienzimasi selama 5 menit. Penyuntikan dilakukan secara berulang-ulang terhadap 1 mM asam urat sebanyak 10 kali, selanjutnya puncak FIA-gram diplot seperti yang diperlihatkan pada Gambar 5.9. Dari hasil ini diketahui rata-rata pengukuran $136,74(\pm 1,55)$ mV dengan harga relatif standar deviasi (RSD=1,13%). Dari hasil ini terlihat bahwa akurasi pengukuran sangat handal, yang memberikan hasil pengukuran yang sangat akurat dengan pengulangan penganalisan.



Gambar 5.8a. Respon FIA untuk analisis 1 mM asam urat secara berulang-ulang ke dalam sistem FIA. Kondisi percobaan menggunakan 5 mM $K_4Fe(CN)_6$ dalam buffer fosfat pH 6,0, 1 unit/ml POx, volume injeksi 50 μ l, laju alir 1,5 ml/min.

5.1.4.4. Penentuan Asam Urat Dalam Sampel

Sampel yang dianalisis divariasikan pada 3 organ tubuh yaitu daging, hati, dan usus pada 5 jenis hewan yaitu ayam, kelinci, kambing, kerbau, dan sapi. Preparasi sampel terlebih dahulu dilakukan untuk mendapatkan ekstrak asam urat sesuai dengan prosedur

preparasi sampel. Setelah diperoleh ekstrak asam urat, sebanyak 50 μl sampel ditambahkan 5 μL enzim urikase (1 unit/ml) dan 5 μl enzim peroksidase (1 unit/ml), reaksi dibiarkan selama 5 menit, kemudian sampel disuntikkan kedalam carrier stream buffer posfat (1 mM, pH 6,0) yang mengandung redoks mediator ferrosianida 5 mM, dengan laju alir 1,5 ml/menit. Perlakuan yang sama dibuat untuk analisis larutan standar seri dan terhadap sampel. Puncak FIA-gram diukur untuk mendapatkan potensial elektroda, selanjutnya diplot terhadap konsentrasi dan menghitung konsentrasi asam urat di dalam sampel. Dari hasil analisis kadar asam urat di dalam sampel dirangkum pada Tabel 5.4.

Tabel 5.4. Hasil pengukuran kadar asam urat di dalam sampel daging segar menggunakan FIA (Angka merupakan hasil rata-rata dari 2 kali pengukuran)

No	Bagian Organ Daging	Kadar asam urat (mg/1 gram sampel)				
		Ayam	Kelinci	Kambing	Kerbau	Sapi
1	Hati	0,1969	0,0596	0,2418	0,1706	0,1978
2	Daging	-	-	-	-	-
3	Usus	-	-	-	-	-

Untuk sampel hati respon elektroda terhadap adanya asam urat sangat baik, ditunjukkan dengan munculnya puncak FIAGram untuk kelima jenis sampel hati. Sedangkan untuk sampel daging otot dan usus tidak terdeteksi keberadaan asam urat. Hal ini mungkin disebabkan oleh rendahnya kadar asam urat di dalam sampel daging otot dan sampel usus, yaitu berada dibawah konsentrasi 0,005 mM, sehingga tidak dapat dideteksi. Penggunaan sampel yang jumlahnya sedikit juga bisa menjadi penyebab tidak terdeteksinya asam urat, karena jumlah asam urat yang diekstraksi menggunakan Li_2CO_3 belum mencapai batas deteksi sistem FIA.

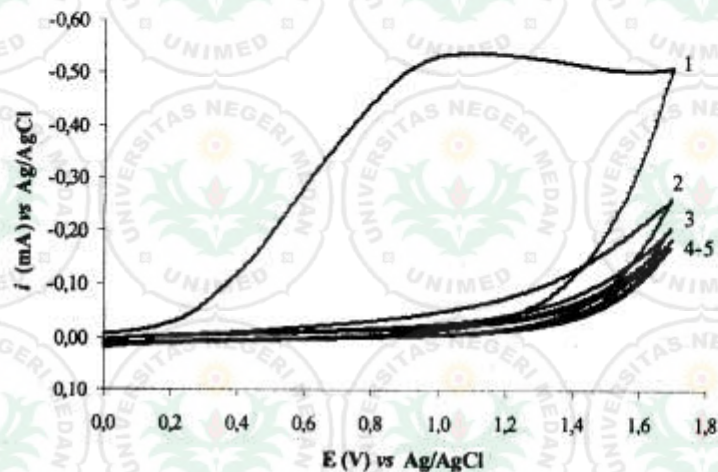
5.2. Hasil Biosensor Elektrokimia Penentuan Asam Urat Dalam Sistem Statik

Dari hasil penelitian tahun kedua yaitu pengembangan biosensor dalam sistem statik diperoleh temuan-temuan tentang pembuatan dan pengembangan biosensor dalam sistem statik yang dapat dipergunakan untuk penentuan asam urat di dalam berbagai jenis sampel makanan dan minuman yang diduga mengandung asam urat. Pada pembahasan disain biosenor dalam sistem statik dikhususkan untuk pengembangan biosensor asam urat. Pengembangan biosensor asam urat dalam sistem statik yang dikembangkan pada tahun kedua ini adalah dalam deteksi amperometri. Hasil temuan secara biosensor juga

dibandingkan dengan hasil analisis biosensor dengan menggunakan spektrofotometri untuk analisis asam urat di dalam berbagai jenis sampel makanan dan minuman. Hasil dan temuan dijelaskan secara terintegrasi dalam pembahasan berikut ini.

5.2.1. Elektropolimerisasi Polityramin Sebagai Matriks Biosensor

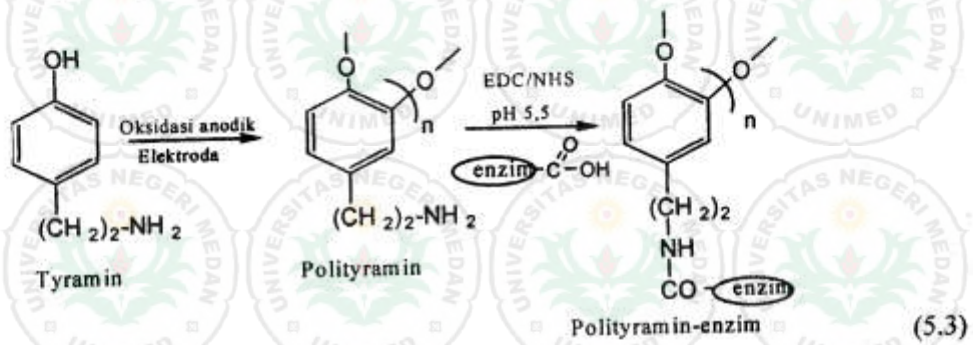
Polimer sangat diperlukan sebagai matriks untuk immobilisasi enzim di dalam pembuatan biosensor elektrokimia. Matriks polimer yang dibutuhkan adalah polityramin yang dibuat secara elektrodeposisi secara siklik voltametry. Dengan menggunakan teknik elektrodeposisi pada 0.00 V dan +1.65 V *versus* Ag/AgCl maka terbentuk polityramin pada permukaan elektroda kerja. Arus oksidasi meningkat pada potensial +0.35 V *vs* Ag/AgCl sebagai pertanda terjadinya reaksi oksidasi tyramin membentuk polityramin. Arus oksidasi pada elektropolimerisasi berikutnya menjadi berkurang sebagai pertanda bahwa polityramin adalah senyawa nonkonduktor, sehingga pada polimerisasi berikutnya seluruh permukaan elektroda telah tertutup dengan polimer yang mengandung enzim (enzim terikat secara fisik pada polimer). Bentuk siklik voltamogram (CV) untuk elektropolimerisasi tyramin pada permukaan elektroda pada 0.00 V dan +1.65 V *versus* Ag/AgCl sebanyak 5 sweep cycle diperlihatkan pada Gambar 5.9.



Gambar 5.9. Voltammogram CV untuk elektrodeposisi polityramin pada elektroda GC/Pt pada 0.50 V s^{-1} pada 0,1 M tyramin dilarutkan dalam buffer fosfat yang mengandung enzim. Elektrodeposisi dilakukan pada 0.00 V dan +1.65 V *versus* Ag/AgCl sebanyak 5 sweep cycle.

Matriks polimer polityramin yang terbentuk pada permukaan elektroda transparan dan terikat kuat sehingga sangat ideal untuk dipergunakan sebagai matriks untuk mengikat enzim urikase (UOx) pada permukaan elektroda kerja. Polimerisasi terjadi pada posisi *ortho*, sama seperti pada elektropolimerisasi senyawa fenol (Pham, *dkk.* 1984), dimana

senyawa terikat satu dengan yang lain pada gugus OH membentuk polimer sementara senyawa amin tidak mengalami perubahan (Situmorang, dkk. 1998). Reaksi kimia elektropolimerisasi dan immobilisasi enzim dijelaskan sebagai berikut. Dalam hal ini polityramin masih memiliki gugus amina dalam strukturnya yang selanjutnya berikatan dengan gugus karboksilat yang terdapat pada enzim urikase sehingga berikatan secara kovalen seperti diperlihatkan pada persamaan reaksi (5.3).

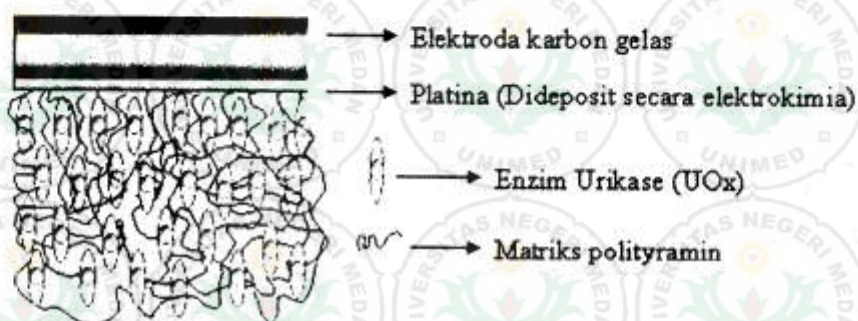


Dalam ikatan kovalen ini tidak mempengaruhi terhadap aktivitas enzim sebagai katalis di dalam perubahan asam urat menjadi alatoin dan hidrogen peroksida. Dalam percobaan sebelumnya yang sudah dilakukan untuk beberapa jenis enzim yang sudah dilakukan diketahui bahwa teknik immobilisasi ini tidak mempengaruhi aktifitas enzim, sehingga dapat digunakan untuk bahan aktif biosensor (Situmorang, dkk. 1998, situmorang, dkk. 1999 dan Situmorang, dkk 2000). Beberapa teknik immobilisasi enzim telah dicobakan untuk mendapatkan elektroda enzim yang memiliki aktivitas baik terhadap asam urat, seperti pengikatan kovalen menggunakan *crosslinking agent* EDC/NHS atau glutaraldehid. Pengikatan enzim secara fisik pada permukaan elektroda dengan menggunakan jaring nilon dan membran poliasetat juga telah dicoba tetapi enzim hanya dapat dipergunakan untuk satu kali analisis karena enzim bocor dan melarut ke dalam larutan.

Dari hasil penelitian diketahui bahwa dua jenis *crosslinking agent* EDC/NHS dan glutaraldehid dapat digunakan untuk mengimobilisasi UOx dengan baik pada permukaan elektroda, sedangkan immobilisasi enzim dengan menggunakan jaring nilon diketahui bahwa enzim tidak stabil, mungkin disebabkan keluarnya (kebocoran) enzim dari permukaan jaring. Di samping itu, kelemahan yang diperoleh dalam ikatan secara fisik ini memberikan respon biosensor yang sangat lambat karena jarak antara enzim dengan elektroda kerja memiliki pembatas sehingga reaksi tidak berlangsung secara spontan, sehingga pengikatan enzim dengan cara ini tidak dilanjutkan, sehingga pengikatan kovalen

menggunakan *crosslinking agent* EDC/NHS atau glutaraldehid. Kedua *crosslinking agent* EDC/NHS dan glutaraldehid memberikan respon yang sensitif terhadap biosensor, akan tetapi dalam studi yang dilakukan sebelumnya sudah terbukti bahwa keterulangan biosensor akan lebih baik apabila dipergunakan *crosslinking agent* EDC/NHS untuk mengikat enzim dengan polityramin (Situmorang, dkk., 1998). Permasalahan yang dicobakan dengan menggunakan membran poliasetat adalah respon elektroda yang sangat rendah dan lambat terhadap asam urat. Dari hasil ini disimpulkan bahwa penggunaan matriks polityramin dan pengikatan menggunakan EDC/NHS menjadi pilihan dalam membuat biosensor asam urat.

Elektroda kerja yang dibuat secara elektrokimia mengandung matriks polityramin yang mengikat enzim urikase secara kovalen di dalam matriks menempel pada permukaan elektroda karbon gelas yang sudah dilapis dengan platina secara elektrokimia. Disain elektroda enzim asam urat yang dikembangkan diilustrasikan seperti pada Gambar 5.10, terdiri atas enzim yang diimobilisasi pada matriks polityramin yang menempel pada elektroda glassy carbon terplatinasi (GC/Pt/PTy/UOx). Lapisan membran polityramin yang mengandung enzim urikase yang menempel pada permukaan elektroda berupa GC/Pt/PTy/UOx sangat tipis dan tidak dapat diidentifikasi dengan mata telanjang. Untuk mengetahui bentuk permukaan elektroda harus dilakukan menggunakan scanning electron microscope (SEM).

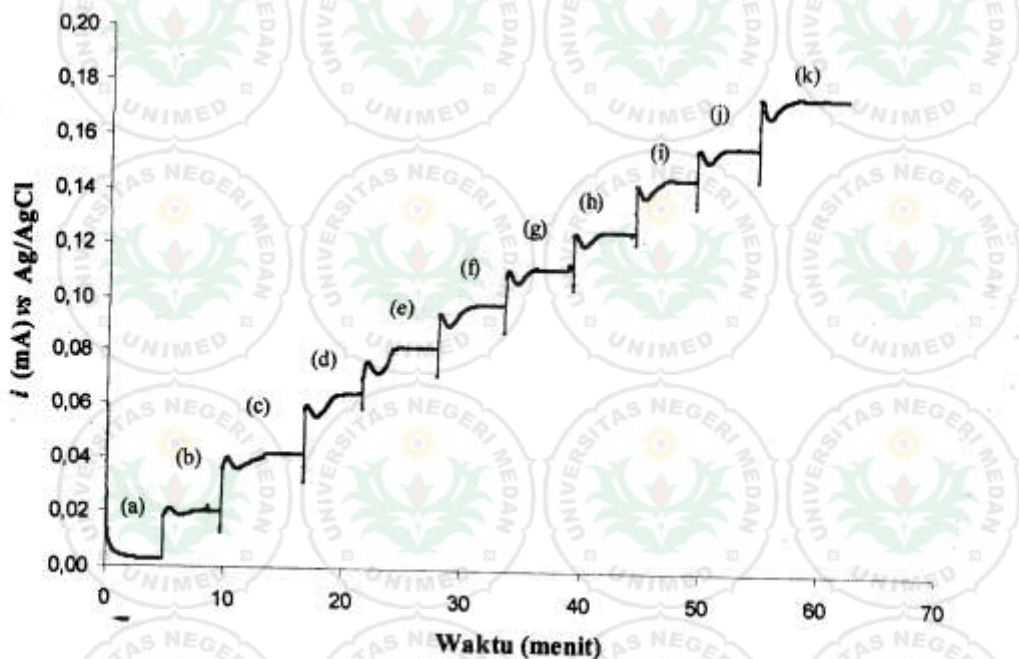


Gambar 5.10. Skema biosensor asam urat (GC/Pt/PTy/UOx) dengan immobilisasi enzim urikase pada matriks polityramin pada permukaan elektroda karbon gelas terplatinasi (GC/Pt).

5.2.2. Respon Biosensor Terhadap Asam Urat

Setelah biosensor asam urat dibuat dengan cara immobilisasi enzim urat oksidase atau urikase, E.C 1.7.3.3 (UOx) pada matriks polityramin menghasilkan enzim elektroda asam urat (GC/Pt/PTy/UOx), selanjutnya biosensor diuji responnya terhadap asam urat, yaitu menggunakan larutan asam urat standar yang dilarutkan di dalam larutan 4% Li_2CO_3 .

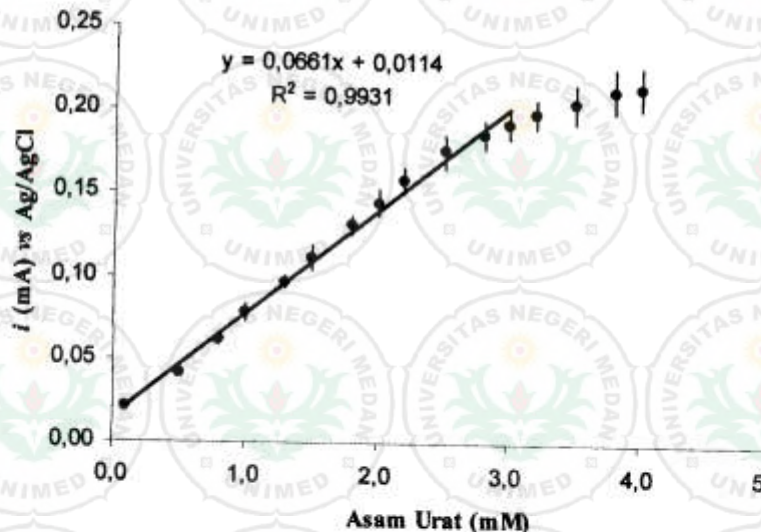
Respon biosensor terhadap analit dilakukan berdasarkan besarnya arus yang terdapat pada sel elektrokimia yang berasal dari reaksi oksidasi analit oleh adanya katalis enzim yang diimobilisasi pada permukaan elektroda. Prinsip dasar penentuan asam urat menggunakan biosensor adalah berdasarkan reaksi enzimasi seperti diperlihatkan pada persamaan reaksi 2.1 dan persamaan reaksi 2.2. Dengan kehadiran enzim uricase (EC 1.7.3.3), asam urat dioksidasi menjadi allantoin, karbon monoksida dan hidrogen peroksida. Hidrogen peroksida selanjutnya dioksidasi pada permukaan elektroda karbon gelas terplatinasi (persamaan reaksi 2.2) menghasilkan arus yang setara dengan konsentrasi asam urat di dalam sampel. Arus yang dihasilkan dalam reaksi enzimasi dideteksi secara amperometri dalam sel elektrokimia. Bentuk respon biosensor terhadap asam urat diperlihatkan pada Gambar 5.11.



Gambar 5.11. Respon biosensor asam urat (GC/Pt/PTy/UOx) terhadap larutan standard asam urat, berturut-turut: (a) 0,0 mM, (b) 0,1 mM, (c) 0,5 mM, (d) 0,8 mM, (e) 1,0 mM, (f) 1,3 mM, (g) 1,5 mM, (h) 1,8 mM, (i) 2,0 mM, (j) 2,2 mM, dan (k) 2,5 mM asam urat. Analisis dilakukan pada potensial konstan 0,6 V vs Ag/AgCl di dalam buffer fosfat (0,01 M, pH 6,0). Matriks polityramin dibuat secara CV sebanyak 5 sweep cycle seperti pada prosedur percobaan pada Gambar 5.9.

Arus yang terbentuk dalam sistem elektrokimia, yaitu berasal dari hidrogen peroksida yang dihasilkan dari reaksi enzimasi, semakin meningkat setara dengan meningkatnya konsentrasi asam urat yang ditambahkan ke dalam sel elektrokimia. Kurva kalibrasi respon

biosensor terhadap larutan standar asam urat pada skala konsentrasi rendah (0,1 – 2,5 mM) diperlihatkan pada Gambar 5.12. Dari kurva kalibrasi terlihat bahwa biosensor asam urat memberikan respon yang sensitif terhadap asam urat, slop 0,066 $\mu\text{A}/\text{mM}$ asam urat. Studi lebih lanjut agar linearitas pengukuran asam urat semakin lebar masih perlu mendapat perhatian dalam studi lanjutan, sehingga uji linearitas pada studi ini masih dilakukan sampai pada tingkat konsentrasi asam urat tertinggi dimana biosensor tidak lagi menunjukkan peningkatan arus respon terhadap asam urat pada konsentrasi 4 mM asam urat.



Gambar 5.12. Kurva kalibrasi larutan standar asam urat yang dianalisis menggunakan biosensor asam urat (GC/Pt/PTy/UOx), yaitu rata-rata dari 5 elektroda kerja seperti pada respon elektroda pada Gambar 5.11. Prosedur pembuatan elektroda dilakukan sama seperti pada Gambar 5.9.

Skala linearitas biosensor asam urat yang berada pada 0,1 – 2,5 mM asam urat sudah mencukupi untuk dipergunakan pada analisis asam urat yang terdapat di dalam sampel makanan dan minuman yang mengandung asam urat. Apabila di dalam sampel makanan dan minuman terdapat asam urat pada skala konsentrasi 0,1 mM – 2,5 mM asam urat maka sampel langsung dianalisis tanpa pengenceran atau pemekatan sampel. Akan tetapi, apabila sampel mengandung asam urat tidak berada pada skala konsentrasi 0,1 mM – 2,5 mM asam urat maka terhadap sampel diperlukan perlakuan tambahan berupa pemekatan sampel atau pengenceran sampel sesuai dengan kebutuhan untuk analisis asam urat menggunakan biosensor. Diduga kebanyakan sampel makanan dan minuman yang dianalisis berada pada skala linearitas biosensor, hanya beberapa sampel yang mengandung kadar asam urat di

bawah skala linearitas sehingga untuk sampel yang berada di bawah skala konsentrasi ini akan dilakukan pemekatan sampel dalam analisis asam urat.

5.2.3. Kondisi Optimum Biosensor Asam Urat

Untuk mendapatkan respon elektroda yang optimum terhadap penentuan asam urat, dilakukan optimasi biosensor meliputi pengaruh ketebalan matriks polityramin yang digunakan dalam immobilisasi AOX, pengaruh konsentrasi dan pH larutan buffer, pengaruh enzim dan cara penyimpanannya. Beberapa parameter percobaan yang sedang dan akan dilakukan untuk menjadikan biosensor penentuan asam urat menjadi instrumen analisis yang baik untuk penentuan asam urat di dalam sampel makanan dan minuman.

5.2.3.1. Pengaruh matriks polityramin

Dari hasil studi sebelumnya telah diketahui bahwa ketebalan matriks polityramin yang terdeposit pada permukaan elektroda adalah setara dengan jumlah sweep cycle yang dilakukan untuk mendeposit polityramin. Pengaruh ketebalan matriks polityramin terhadap sensitivitas biosensor dipelajari untuk melihat apakah dengan semakin tebal matriks polimer sebagai membran berpengaruh terhadap sensitivitas respon biosensor terhadap asam urat. Empat buah elektroda dibuat dengan variasi matriks polimer yang berbeda, yaitu matriks polityramin dibuat secara CV berturut-turut sebanyak 3 sweep cycle, 5 sweep cycle, 7 sweep cycle, dan 10 sweep cycle. Jumlah mol polimer terdeposit pada permukaan elektroda dihitung berdasarkan arus yang dibutuhkan dengan kecepatan scan pada saat elektropolimerisasi sesuai dengan luas area elektroda seperti dirangkum pada Tabel 5.5.

Tabel 5.5. Banyaknya polityramin terdeposit pada permukaan elektroda dengan bertambahnya jumlah elektropolimerisasi (sweep cycle) dan sensitivitas biosensor terhadap asam urat standar berdasarkan slop (mA/mM). Kondisi percobaan pada Gambar 5.1.

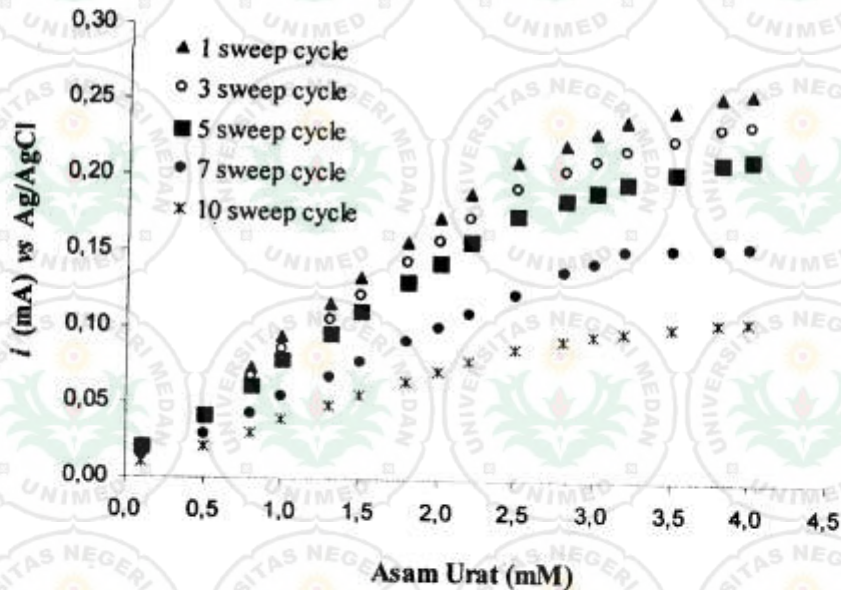
Siklik voltametri, CV (<i>sweep cycle</i>)	Total area CV (cm^2) [*]	Polityramin terdeposit (mmol) ^{**}	Sensitivitas biosensor (Slope mA/mM) ^{***}
1 kali	0,11002	0,0323	0,0815
3 kali	0,13196	0,0405	0,0739
5 kali	0,14299	0,0419	0,0661
7 kali	0,15058	0,0442	0,0463
10 kali	0,15894	0,0466	0,0330

* Area elektroda dihitung dengan metode hidrodinamik menggunakan rotating disk electrode (RDE)

** Dihitung berdasarkan arus yang dibutuhkan pada saat elektropolimerisasi

*** Sensitivitas biosensor dihitung dari kurva kalibrasi larutan standar asam urat

Ke empat elektroda GC/Pt/PTy/UO_x yang dibuat dengan variasi ketebalan membran polityramin dipergunakan untuk analisis asam urat standar. Dari bentuk kurva kalibrasi larutan standar asam urat yang dihasilkan oleh biosensor elektrokimia diketahui bahwa biosensor yang memiliki ketebalan membran berbeda akan memberikan respon sensitivitas yang berbeda terhadap asam urat. Bentuk kurva kalibrasi biosensor asam urat dengan ketebalan membran bervariasi diperlihatkan pada Gambar 5.13, dan sensitivitas biosensor berdasarkan slop (mA/mM) untuk kurva kalibrasi larutan standar yang linier dirangkum pada Tabel 5.5.



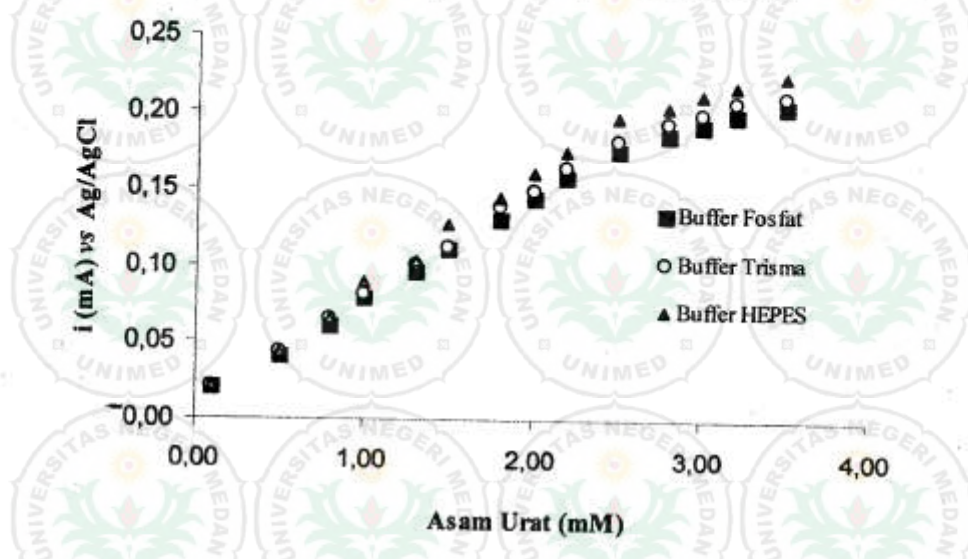
Gambar 5.13. Kurva kalibrasi larutan standar asam urat yang dianalisis menggunakan biosensor asam urat (GC/Pt/PTy/UO_x) yang mengandung matriks polityramin bervariasi yang dibuat secara CV pada 1-10 sweep cycle. Prosedur pembuatan elektroda sama seperti pada Gambar 5.9.

Dari bentuk kurva kalibrasi biosensor asam urat dengan variasi polityramin berbeda terlihat bahwa pola bentuk kurva kalibrasi hampir sama untuk masing-masing biosensor, yang berbeda adalah sensitivitas. Semakin banyak polityramin yang terdeposit pada permukaan elektroda maka sensitivitas biosensor akan semakin berkurang (Tabel 5.5). Berkurangnya sensitivitas pendeteksian biosensor terhadap asam urat dengan semakin tebalnya membran elektroda membuktikan bahwa polityramin yang terdeposit termasuk polimer yang nonkonduktif sehingga memungkinkan untuk dipergunakan untuk menghambat senyawa pengganggu dalam penentuan asam urat. Di samping itu, fenomena ini meyakinkan hasil perhitungan bahwa meningkatkan jumlah sweep cycle dalam elektrodeposisi polimer juga akan meningkatkan jumlah polimer yang terdeposit tetapi

tidak sampai menghambat arus yang melewati permukaan elektroda dalam biosensor elektrokimia. Untuk mendapatkan biosensor elektrokimia dengan sensitivitas yang baik dan memiliki toleransi di dalam menghambat senyawa pengganggu maka elektroda terbaik yang dipergunakan dalam analisis asam urat pada sampel makanan dan minuman adalah yang dibuat secara CV sebanyak 5 sweep cycle.

5.2.3.2. Pengaruh buffer terhadap sensitivitas biosensor

Untuk mengetahui pengaruh buffer terhadap sensitivitas biosensor asam urat, telah dilakukan studi dengan menggunakan berbagai jenis larutan buffer yang biasa dipergunakan dalam analisis senyawa biologi dan yang tidak mengganggu terhadap reaksi enzimasi seperti buffer fosfat, buffer Trisma, dan buffer HEPES. Ke tiga jenis buffer dibuat pada kondisi yang sama yaitu pada konsentrasi 10 mM dan pH 6,0, yaitu konsentrasi dan pH yang memberikan sensitivitas tertinggi pada saat menggunakan buffer fosfat. Biosensor elektrokimia dibuat secara CV sebanyak 5 sweep cycle digunakan untuk analisis asam urat standar dengan variasi jenis larutan buffer, dan respon biosensor pada penentuan asam urat di dalam berbagai jenis larutan buffer diperlihatkan pada Gambar 5.14.



Gambar 5.14. Kurva kalibrasi larutan standar asam urat di dalam berbagai jenis larutan buffer pada konsentrasi 10 mM, pH 6,0. Biosensor GC/Pt/PTy/UOx dibuat secara CV sebanyak 5 sweep cycle.

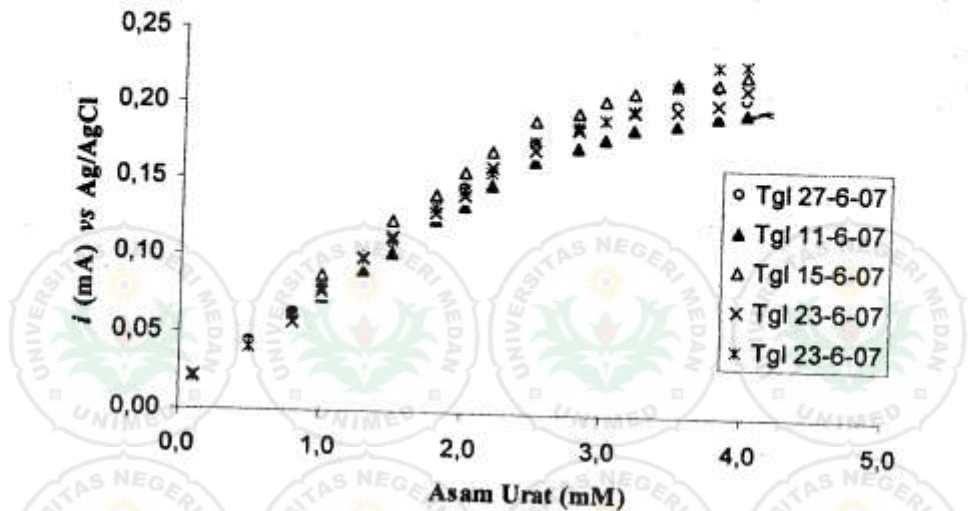
Biosensor elektrokimia menunjukkan signal yang baik di dalam tiga jenis larutan buffer, yaitu buffer fosfat, trisma dan HEPES, berarti tiga jenis larutan buffer ini sangat sesuai untuk reaksi enzimasi katalisis perubahan asam urat menjadi alatoxin dan hidrogen peroksida di dalam sel elektrokimia. Biosensor elektrokimia juga menunjukkan sensitivitas yang hampir sama dengan pola kurva kalibrasi yang hampir sama di dalam tiga jenis

larutan buffer. Sensitivitas biosensor di dalam larutan buffer dari yang paling tinggi berturut-turut adalah buffer HEPES slope 0,0747 mA/mM asam urat, buffer Trisma 0,0684 mA/mM asam urat, dan buffer Fosfat 0,0661 mA/mM asam urat. Dapat dinyatakan bahwa biosensor memberikan respon yang baik di dalam berbagai jenis larutan buffer karena tidak mengganggu di dalam reaksi enzimasi. Walaupun sensitivitas biosensor sedikit lebih rendah di dalam larutan buffer fosfat akan tetapi kecepatan respon untuk mendapatkan kestabilannya lebih cepat di dalam larutan buffer fosfat dibanding dua jenis larutan buffer lain karena berfungsi ganda sebagai larutan buffer dan sebagai elektrolit yang membantu dalam proses deteksi elektrokimia. Dengan alasan ini maka studi lebih lanjut dilakukan di dalam larutan buffer fosfat 10 mM, pH 6,0.

5.2.4. Keterulangan Biosensor Asam Urat

Walaupun biosensor telah banyak yang berhasil dibuat dan dipublikasikan, akan tetapi masih sangat jarang biosensor diperdagangkan untuk aplikasi. Salah satu kelemahan yang membuat biosensor tidak ada dipasaran adalah disebabkan oleh rendahnya keterulangan pembuatan biosensor, sehingga aplikasinya juga menjadi sangat terbatas. Agar biosensor asam urat dapat diyakinkan penggunaannya maka dilakukan studi keterulangan biosensor, yaitu dengan cara membuat biosensor asam urat dengan prosedur yang sama, akan tetapi menggunakan larutan (stok) yang berbeda dan pada waktu yang berbeda pula. Lima buah biosensor dibuat pada waktu yang berlainan, kemudian dipergunakan untuk penentuan asam urat standar. Keterulangan diperlihatkan dari kurva kalibrasi larutan standar asam urat yang dianalisis menggunakan elektroda GC/Pt/PtY/UOx, dan hasil pengukuran untuk masing-masing biosensor diperlihatkan pada Gambar 5.15.

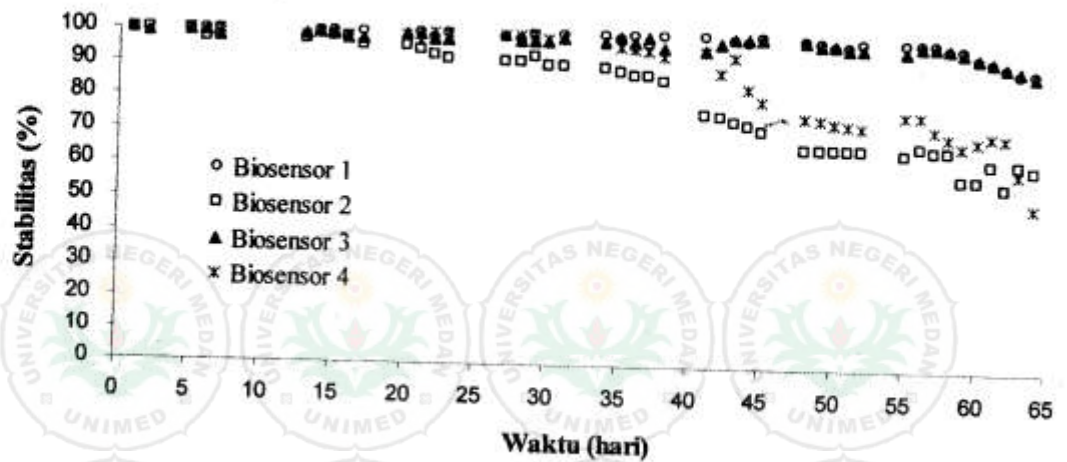
Dari hasil studi keterulangan biosensor terlihat bahwa biosensor asam urat memiliki tingkat keterulangan tinggi, yaitu biosensor yang dibuat pada waktu yang berbeda dengan prosedur yang sama menghasilkan respon yang hampir sama, diperlihatkan dari hasil rata-rata untuk lima buah biosensor, koefisien variasi pada konsentrasi rendah ($CV=0,02$), dan koefisien variasi pada konsentrasi tinggi ($CV=0,09$). Hasil ini sangat menggembirakan, dimana metode analisis dengan keterulangan pada koefisien variasi sampai ($CV=16$) masih diperbolehkan untuk analisis secara elektrokimia. Dengan demikian, biosensor yang dikembangkan dalam studi ini sudah memenuhi syarat dalam hal tingkat kepercayaan analisis untuk penentuan analit secara elektrokimia sehingga sudah layak untuk dipergunakan pada penentuan asam urat di dalam sampel makanan dan minuman.



Gambar 5.15. Keterulangan biosensor asam urat: lima buah biosensor dibuat pada waktu yang berbeda dari larutan stok berbeda, tetapi menggunakan prosedur sama. Prosedur pembuatan biosensor dan analisis sampel dilakukan sama seperti pada Gambar 5.11.

5.2.5. Stabilitas Biosensor Asam Urat

Untuk meyakinkan potensi biosensor asam urat untuk penentuan asam urat di dalam sampel makanan dan minuman maka dilakukan studi stabilitas biosensor bertujuan untuk mengetahui tingkat stabilitas biosensor berdasarkan penyimpanan dan penggunaannya pada berbagai kondisi dan lama pemakaian. Dalam studi ini, sebanyak empat buah biosensor dibuat dengan 5 sweep cycle, dan elektroda digunakan berulang-ulang, yaitu melakukan 1 kali pengukuran setiap hari untuk perlakuan yang berbeda-beda pada masing-masing biosensor sebagai berikut: (1) biosensor disimpan dalam keadaan kering (temperatur kamar) dan digunakan berulang-ulang setiap hari, (2), biosensor disimpan di dalam buffer fosfat pada suhu kamar dan digunakan berulang-ulang setiap hari, (3) biosensor disimpan dalam keadaan kering pada suhu 4 °C dan digunakan berulang-ulang setiap hari, dan (4) biosensor disimpan di dalam buffer pada suhu 4 °C dan digunakan berulang-ulang setiap hari. Semua biosensor dibuat pada tgl 1 Mei 2007 dan digunakan mulai pada pada tgl 10 Mei 2007, akan tetapi pada saat hari libur dan hari besar maka biosensor tidak dipergunakan (tidak dilakukan pengukuran), bila elektroda tidak dipergunakan maka elektroda disimpan sesuai dengan kondisi percobaan yang diinginkan (penjelasan pada caption Gambar 5.8). Pengukuran terhadap larutan standar 1 mM asam urat dilakukan dengan menggunakan biosensor GC/Pt/PtY/UOx pada 0,6 V vs Ag/AgCl. Hasil pengukuran untuk mengetahui stabilitas biosensor berdasarkan pemakaian berulang-ulang selama 65 hari diperlihatkan pada Gambar 5.16.



Gambar 5.16. Stabilitas biosensor asam urat berdasarkan penggunaan dan penyimpanannya. Empat buah biosensor dibuat pada waktu yang sama menggunakan prosedur sama, tetapi variasi perlakuan penyimpanan: (1) biosensor disimpan dalam keadaan kering pada suhu kamar, (2) biosensor disimpan di dalam buffer fosfat pada suhu kamar, (3) biosensor disimpan dalam keadaan kering pada suhu 4 °C, dan (4) biosensor disimpan di dalam larutan buffer pada suhu 4 °C. Prosedur pembuatan biosensor dan analisis sampel dilakukan sama seperti pada Gambar 5.11.

Penggunaan biosensor dan cara penyimpanannya sangat berpengaruh terhadap stabilitas biosensor asam urat. Biosensor asam urat yang dibuat dengan prosedur yang sama memberikan respon yang hampir sama pada minggu pertama penggunaannya. Akan tetapi, setelah biosensor digunakan secara rutin dalam jangka waktu yang lama terlihat bahwa stabilitas biosensor sangat dipengaruhi cara penyimpanan biosensor setelah dipergunakan. Biosensor (1) yang digunakan secara rutin dan disimpan dalam keadaan kering (temperatur kamar) menunjukkan stabilitas yang sangat baik. Tidak ada perubahan respon biosensor pada pemakaian sampai pada 55 hari, dan hanya mengalami penurunan respon biosensor sebanyak 3% setelah dipergunakan selama 60 hari. Hasil ini menunjukkan bahwa biosensor stabil pada suhu kamar dalam keadaan kering, sebagai bukti bahwa teknik immobilisasi enzim di dalam matriks polityramin sangat sesuai untuk enzim urikase. Biosensor (2) yang disimpan di dalam buffer fosfat pada suhu kamar dan digunakan secara rutin dalam jangka waktu yang cukup lama menunjukkan respon yang stabil sampai pada pemakaian 14 hari, selanjutnya biosensor menunjukkan penurunan stabilitas secara perlahan sampai pada penurunan 3% setelah pemakaian 33 hari. Akan tetapi, biosensor mengalami penurunan respon sebanyak 15% setelah penggunaan selama 45 hari, dan dilanjutkan dengan penurunan respon yang sangat besar mulai hari ke 46 sampai hari ke 60, yaitu mengalami penurunan sensitivitas sampai 40%. Hasil ini menandakan bahwa biosensor asam urat lebih

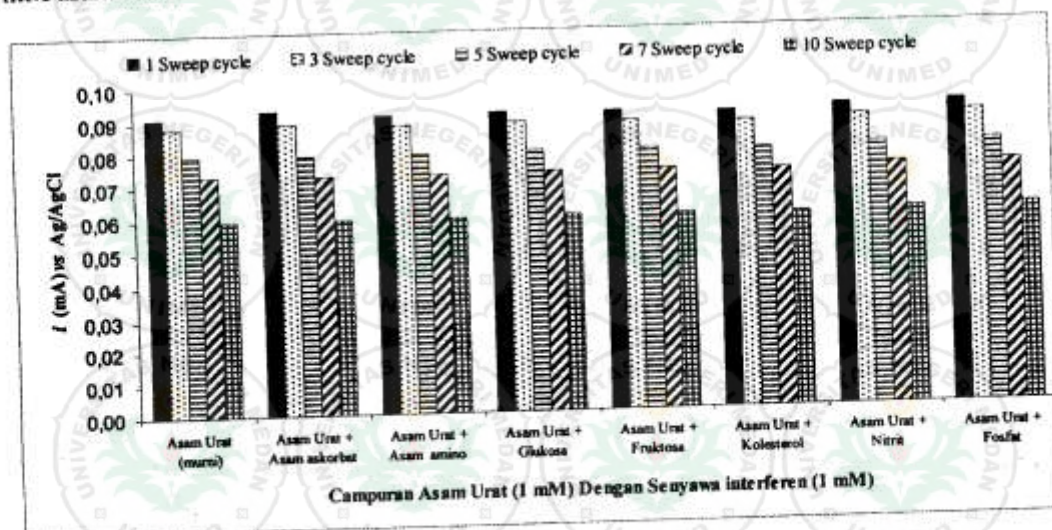
stabil bila disimpan dalam keadaan kering dibanding dengan penyimpanan dalam keadaan basah di dalam larutan buffer.

Studi pengaruh suhu penyimpanan terhadap stabilitas biosensor asam urat dilakukan terhadap biosensor (3) yang disimpan dalam keadaan kering pada suhu 4 °C dan digunakan secara rutin. Biosensor (3) menunjukkan stabilitas yang sangat baik pada penyimpanan dalam keadaan kering pada suhu 4 °C, yaitu tidak menunjukkan penurunan sensitivitas setelah pemakaian cukup lama. Hasil ini hampir sama dengan hasil yang diperoleh pada biosensor (1) yang disimpan dalam keadaan kering pada suhu kamar, yaitu memiliki stabilitas yang baik untuk jangka waktu penggunaan yang cukup lama. Dapat dinyatakan bahwa pengaruh suhu terhadap penyimpanan biosensor asam urat dalam kondisi kering tidak menunjukkan hasil yang berbeda, berarti biosensor asam urat sangat baik bila disimpan dalam keadaan kering setelah penggunaannya, dapat disimpan pada suhu kamar atau pada suhu rendah 4 °C. Sementara itu, studi pengaruh suhu terhadap stabilitas biosensor pada penyimpanan di dalam larutan buffer dilakukan terhadap biosensor (4) yang disimpan di dalam buffer pada suhu 4 °C. Dengan penggunaan yang rutin pada jangka waktu lama terlihat bahwa biosensor asam urat yang disimpan di dalam larutan buffer pada 4 °C menunjukkan stabilitas yang cukup baik sampai pada pemakaian 25 hari, kemudian menunjukkan penurunan sensitivitas sebanyak 3% setelah dipergunakan secara rutin selama 39 hari, dan penurunan sensitivitas secara perlahan terjadi, yaitu penurunan respon sebanyak sekitar 10% setelah pemakaian 44 hari. Penurunan sensitivitas yang cukup besar terjadi pada biosensor setelah dipergunakan selama 56 hari, yaitu sekitar 20%, dan dilanjutkan pada penurunan sensitivitas sebesar 55% setelah dipergunakan selama 65 hari. Dari hasil ini terlihat bahwa biosensor asam urat yang disimpan di dalam larutan buffer pada suhu kamar mengalami penurunan sensitivitas lebih cepat dibanding dengan biosensor yang disimpan di dalam larutan buffer pada suhu 4 °C. Dari hasil ini disimpulkan bahwa biosensor asam urat akan memiliki stabilitas lebih baik bila disimpan dalam keadaan kering pada suhu kamar atau pada suhu 4 °C.

5.2.6. Selektifitas Biosensor Asam Urat

Untuk mengetahui selektifitas biosensor terhadap asam urat maka dilakukan uji selektifitas terhadap senyawa (analit) yang diduga sebagai pengganggu (interferen) dalam penentuan asam urat. Uji selektifitas biosensor asam urat dilakukan menggunakan beberapa biosensor dengan ketebalan membran bervariasi. Biosensor asam urat dibuat 1-10 kali (sweep cycle) secara elektrokimia CV seperti diperlihatkan pada Gambar 5.5, dan selanjutnya dipergunakan untuk penentuan asam urat yang mengandung senyawa

pengganggu (interferen) pada konsentrasi diatas rata-rata yang diduga mungkin terdapat di dalam sampel, seperti asam askorbat, glukosa, fruktosa, kolesterol, dan asam amino, dan beberapa anion yang dianggap sebagai pengawet makanan seperti nitrit dan fosfat dengan mencampurkan senyawa tersebut ke dalam asam urat standar. Pertama sekali dilakukan pengukuran terhadap senyawa interferen pada konsentrasi 1 mM, kemudian dilanjutkan dengan mencampurkan 1 mM senyawa interferen dengan 1 mM asam urat standar seperti diperlihatkan pada Gambar 5.17. Dari hasil diketahui bahwa biosensor asam urat dengan variasi ketebalan membran polityramin memberikan respon sensitivitas yang menurun dengan meningkatnya ketebalan membran polityramin. Untuk masing-masing biosensor diketahui bahwa senyawa interferen tidak mempengaruhi signal, yaitu tidak ada perubahan signal biosensor oleh kehadiran 1 mM senyawa interferen yang dicampurkan ke dalam 1 mM asam urat.



Gambar 5.17. Respon biosensor asam urat terhadap asam urat yang mengandung senyawa interferen (masing-masing 1 mM senyawa interferen). Biosensor asam urat dengan variasi ketebalan membran polityramin yang dibuat secara CV pada 1-10 sweep cycle seperti pada Gambar 5.1.

Studi lebih lanjut terhadap pengaruh senyawa pengganggu (interferen) terhadap respon biosensor elektrokimia dilakukan dengan menggunakan biosensor yang dibuat pada 5 sweep cycle. Ke dalam sel elektrokimia disuntikkan senyawa interferen tunggal (1 mM) dan respon biosensor diukur. Selanjutnya ke dalam sel elektrokimia disuntikkan campuran 1 mM asam urat dan 1 mM senyawa pengganggu (interferen), kemudian respon biosensor diukur. Hasil pengukuran yaitu rata-rata 5 kali pengukuran untuk masing-masing 1 mM senyawa interferen tunggal dan campuran antara asam urat 1 mM dengan interferen 1 mM di rangkum di pada Table 5.6.

Tabel 5.6. Respon biosensor asam urat (GC/Pt/PTy/UOx) terhadap analisis 1 mM asam urat dengan kehadiran 1 mM berbagai jenis senyawa pengganggu dan anion yang dianggap sebagai interferen

No	Senyawa pengganggu (interferen), 1 mM	Respon biosensor elektrokimia (mA)* terhadap senyawa		
		Interferen tunggal (1 mM)	Campuran 1 mM Asam Urat dan 1 mM interferen	Selisih**
1	Asam Urat	0,0793±0,003	0,0793±0,003	0,0000
2	Asam askorbat,	0,0512±0,005	0,0812±0,005	0,0019
2	Asam amino	0,0012±0,003	0,0793±0,003	-0,0000
3	Glukosa	0,0020±0,001	0,0796±0,002	0,0003
4	Fruktosa	0,0003±0,002	0,0793±0,002	0,0000
5	Kolesterol	0,0007±0,001	0,0787±0,002	-0,0006
6	Nitrit (NO ₂ ⁻)	0,0009±0,003	0,0798±0,003	0,0005
7	Fosfat (PO ₄ ³⁻)	0,0010±0,005	0,0800±0,005	0,0007

*Rata-rata 5 pengukuran dan standar deviasi

**Selisih adalah perbedaan arus yang dihasilkan oleh 1 mM asam urat dengan 1 mM interferen yang ditambahkan ke dalam 1mM asam urat standar

Dari hasil pengukuran terlihat bahwa hampir semua senyawa interferen tidak memberikan respon terhadap biosensor asam urat. Hampir semua senyawa interferen dalam konsentrasi sangat tinggi (1 mM) tidak memberikan respon terhadap biosensor elektrokimia, kecuali asam askorbat yang memberikan respon 51,2 μ A, akan tetapi konsentrasi sebesar ini tidak akan ditemukan di dalam sampel yang sebenarnya. Pengaruh senyawa pengganggu dilihat dari selisih pengukuran campuran asam urat dengan senyawa pengganggu dikurangi terhadap respon senyawa asam urat (tanpa kehadiran senyawa pengganggu). Dari perubahan sensitivitas terlihat bahwa kehadiran senyawa pengganggu tidak mempengaruhi respon biosensor asam urat. Kehadiran asam askorbat pada 1 mM memberikan respon terhadap biosensor asam urat, akan tetapi dengan mencampurkan 1 mM asam urat dengan 1 mM asam askorbat hanya sedikit menambah sensitivitas biosensor asam urat, yaitu 1,9 μ A, sedangkan senyawa lain tidak memberikan penambahan respon biosensor. Dapat dinyatakan bahwa membran polityramin dideposit secara elektrokimia yang dipergunakan sebagai matriks polimer dalam biosensor dapat berfungsi ganda, yaitu sebagai matriks untuk immobilisasi enzim dan sekaligus sebagai pelindung elektroda dari masuknya senyawa pengganggu pada permukaan elektroda dalam deteksi amperometri, sehingga arus yang diukur hanya berasal dari perubahan hidrogen peroksida yang dihasilkan dari reaksi enzimasi perubahan asam urat.

5.2.7. Uji Akurasi Biosensor Asam Urat

Untuk mengetahui keakuratan metode biosensor untuk penentuan asam urat di dalam sampel makanan dan minuman, maka dilakukan uji akurasi biosensor dengan cara menganalisis sampel standar asam urat yang sudah diketahui kadar asam urat dengan tepat, yaitu sampel makanan yang sudah mengandung senyawa asam urat (Accutrol normal, Accutrol elevated dan 4 buah standar asam urat) yang diperoleh dari Sigma Co. Terhadap sampel standar asam urat, penentuan asam urat dilakukan menggunakan metode standar (Spektrofotometri) sebagaimana disarankan oleh produser (Sigma Co.), dan dengan menggunakan metode analisis biosensor. Terhadap sampel standar, dilakukan perlakuan sampel sesuai dengan yang dijelaskan dalam manual katalog Sigma Co. Sampel diencerkan sesuai dengan instruksi yang dijelaskan dalam manual katalog Supplier (Sigma Co). Analisis penentuan asam urat dengan biosensor dilakukan dengan cara mengukur larutan standar asam urat secara seri kemudian dilanjutkan dengan analisis sampel tanpa perlakuan sampel (sampel langsung disuntikkan ke dalam sel elektrokimia). Sebagai pembanding, penentuan asam urat dilakukan secara spektrofotometri (metode standar) mengikuti prosedur yang dijelaskan oleh supplier Sigma Co. Satuan pengukuran adalah dalam μM . Hasil analisis penentuan asam urat di dalam sampel standar makanan dan minuman dari pabrik dirangkum pada Tabel 5.7.

Tabel 5.7. Penentuan asam urat dalam sampel standar asam urat menggunakan biosensor dan menggunakan metode standar (spektrofotometri UV-Vis). Angka adalah kadar asam urat dari hasil rata-rata 3 kali pengukuran dan standar deviasinya.

Sampel Standar (Sigma Co.)	Asam urat (mM)			Temuan	
	Sebenarnya	Spektrofotometri UV-Vis**	Biosensor***	Metode Standar	Biosensor
Accutrol Normal	0,0327	0,0315±0,0008	0,0333±0,0001	96	102
Accutrol Elevated	0,0518	0,0490±0,0007	0,0520±0,0004	95	100
Standar Asam Urat 1	0,0291	0,0291±0,0008	0,0296±0,0003	100	102
Standar Asam Urat 2	0,0333	0,0316±0,0031	0,0339±0,0001	95	102
Standar Asam Urat 3	0,0345	0,0339±0,0017	0,0349±0,0003	98	101
Standar Asam Urat 4	0,0327	0,0320±0,0023	0,0335±0,0001	98	102

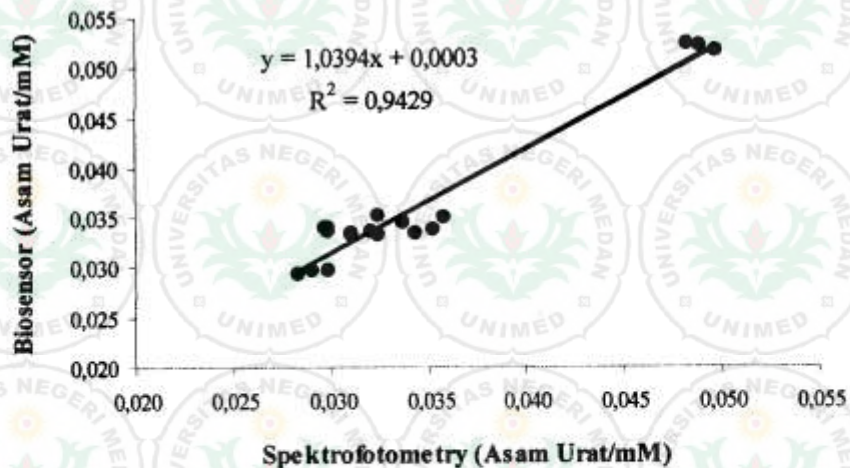
* Kadar sebenarnya diperoleh dari supplier (Sigma Co.)

**Metode standar menggunakan spektrofotometri dengan reaksi enzimasi menggunakan *o*-dianisidin pada $\lambda 520 \text{ nm}$

***Metode biosensor secara elektrokimia pada potensial konstan $E=0,60 \text{ mV}$ vs Ag/AgCl dalam buffer fosfat

Penentuan asam urat di dalam sampel menggunakan biosensor menunjukkan hasil yang sangat baik, yaitu temuan kadar asam urat di dalam sampel hampir sama dengan kadar asam urat yang sebenarnya yang direkomendasikan oleh supplier, yaitu temuan asam

urat dibanding terhadap kadar asam urat yang sebenarnya adalah 100-102%. Sementara itu, temuan asam urat di dalam sampel menggunakan metode spektrofotometri dibanding terhadap kadar asam urat yang sebenarnya adalah berada pada kisaran 95-100%. Hasil analisis menggunakan biosensor sedikit lebih tinggi dibanding dengan metode standar, hal ini disebabkan oleh akurasi pengukuran metode biosensor yang lebih baik dibanding akurasi pengukuran dengan menggunakan metode standar, karena pengukuran menggunakan biosensor bebas dari pengaruh senyawa pengganggu. Hasil ini dibuktikan dari hasil analisis menggunakan metode biosensor dengan 3 kali ulangan yang menunjukkan bahwa hasil pengukuran menggunakan metode biosensor mempunyai koefisien variasi antara $\pm 0,0001-0,0004$, sedangkan analisis penentuan dengan menggunakan spektrofotometri mempunyai koefisien variasi $\pm 0,0007-0,0031$.



Gambar 5.18. Penentuan asam urat di dalam sampel standar menggunakan metode analisis biosensor dan metode analisis standar (Metode spektrofotometri-UV-Vis). Plot adalah koefisien korelasi dua jenis metode analisis.

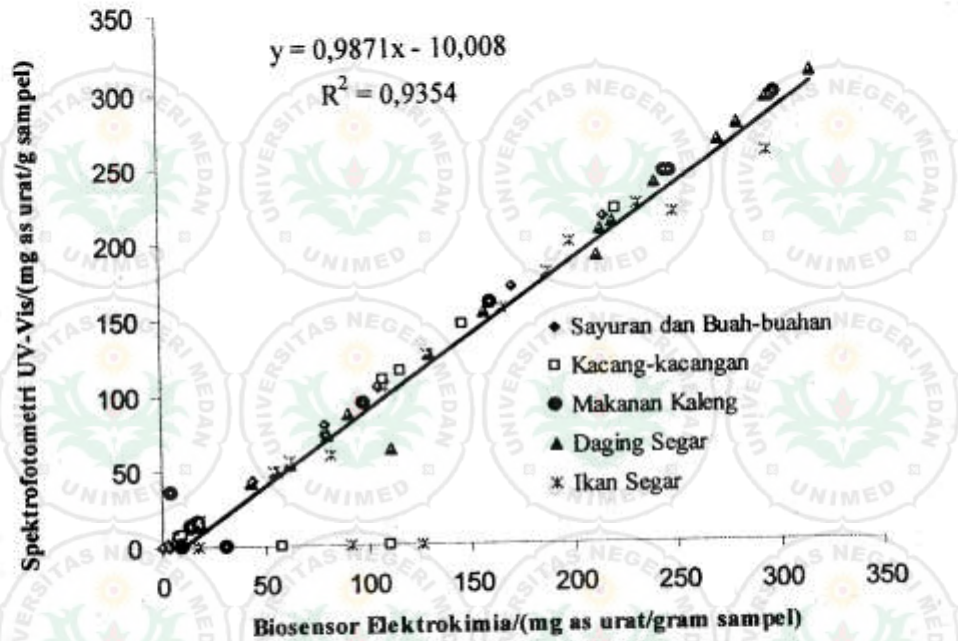
Untuk meyakinkan apakah analisis penentuan asam urat dalam sampel dengan menggunakan metode biosensor memiliki kesamaan dengan analisis asam urat menggunakan metode standar spektrofotometri maka dilakukan perbandingan hasil analisis kedua metode analisis seperti diperlihatkan pada Gambar 5.18. Hasil analisis dari dua jenis metode analisis mempunyai hasil yang hampir sama, yaitu ditunjukkan dari koefisien korelasi $R^2 = 0,943$. dapat dinyatakan bahwa metode analisis biosensor elektrokimia dapat dipergunakan untuk penentuan asam urat di dalam sampel makanan dan minuman tanpa membutuhkan perlakuan sampel yang kompleks seperti yang dilakukan pada metode analisis standar.

5.2.8. Analisis Asam Urat Dalam Makanan dan Minuman

Biosensor asam urat yang dikembangkan dalam studi ini telah dipergunakan untuk penentuan asam urat di dalam sampel makanan dan minuman yang disampling oleh mahasiswa secara acak dari berbagai pasar tradisional dan supermarket di kota Medan, dengan asumsi bahwa sampel yang diambil adalah bahan baku makanan dan minuman yang diduga mengandung asam urat dan menjadi konsumsi masyarakat. Hasil analisis asam urat di dalam sampel makan dan minuman dengan menggunakan biosensor. Untuk meyakinkan apakah hasil analisis yang diperoleh dengan menggunakan biosensor dapat dipercaya maka telah dilakukan analisis perbandingan dengan menggunakan metode standar spektrofotometri UV-Vis secara reaksi enzimatis. Hasil analisis kadar asam urat di dalam makanan dan minuman cair dengan menggunakan Biosensor dan standar spektrofotometri UV-Vis dirangkum pada Tabel 5.8 – Tabel 5.9. Untuk meyakinkan apakah hasil analisis yang diperoleh dengan menggunakan biosensor dapat dipercaya maka telah dilakukan analisis perbandingan dengan menggunakan standar spektrofotometri UV-VIS. Plot antara hasil analisis terhadap kadar asam urat di dalam sampel makanan dan minuman cair yang dianalisis dengan menggunakan biosensor dan standar spektrofotometri UV-VIS diperlihatkan pada Gambar 5.19, dan rangkuman data analisis disajikan pada Lampiran 1, sedangkan data lengkap analisis sampel makanan dan minuman secara biosensor dirangkum pada Lampiran 2, dan data lengkap analisis sampel makanan dan minuman secara spektrofotometri UV-Vis dirangkum pada Lampiran 3.

Dari hasil yang diperlihatkan pada Gambar 5.19 secara umum dapat dinyatakan bahwa penentuan kadar asam urat secara biosensor dan metode standar memiliki hasil yang relatif hampir sama (lihat hasil Tabel 5.8 – Tabel 5.9), yaitu koefisien korelasi antara hasil analisis menggunakan dua metode analisis berada pada $R^2=0,9354$, yang memberikan arti bahwa hasil analisis biosensor sangat dapat dipercaya bila dibandingkan dengan hasil analisis menggunakan metode analisis standar untuk asam urat menggunakan standar spektrofotometri UV-VIS. Untuk melihat hasil penentuan kadar asam urat di dalam makanan dan minuman diketahui temuan bahwa hampir semua hasil analisis menggunakan biosensor lebih tinggi dibanding hasil analisis secara spektrofotometri. Di samping itu, ada beberapa sampel yang dianalisis secara spektrofotometri tidak memberikan hasil (tidak terdeteksi, ND), sedangkan dengan metode analisis biosensor semua sampel dapat dianalisis kadar asam urat yang terkandung di dalam makanan dan minuman. Hal ini disebabkan oleh kelemahan di dalam metode spektrofotometri yang sangat dipengaruhi

oleh warna sampel yang dianalisis, sedangkan penentuan dengan menggunakan biosensor elektrokimia kehadiran zat warna sampel tidak mengganggu di dalam analisis.



Gambar 5.19. Penentuan asam urat di dalam sampel makanan dan minuman menggunakan biosensor elektrokimia dan metode analisis standar spektrofotometri UV-VIS. Plot adalah koefisien korelasi dua jenis metode analisis. Data analisis adalah pada Lampiran 1.

5.2.8.1. Asam urat dalam sayuran dan buah-buahan

Berbagai jenis sayur-sayuran yang dikonsumsi oleh masyarakat dan diperdagangkan secara luas di pasar tradisional dan modern di kota Medan di analisis seperti sayuran: bayam hijau, kangkung, brokoli, daun singkong, daun melinjo, bayam merah, bunga kol, dan buah-buahan: apel, durian, dan alpukat. Penentuan kadar asam urat di dalam beberapa jenis sayur-sayuran dan buah-buahan menggunakan biosensor dan standar spektrofotometri UV-Vis di rangkum pada Tabel 5.8. Dari hasil analisis menggunakan biosensor elektrokimia diketahui bahwa kadar asam urat tertinggi terkandung pada sayur brokoli (105,60 mg/kg sampel), sedangkan pada sayur bunga kol (43,77 mg/kg sampel). Kadar asam urat di dalam sayur bayam (9,69 mg/kg sampel) dan kangkung (4,27 mg/kg sampel) tergolong rendah, sementara kadar terendah diperoleh pada sayur daun melinjo (0,58 mg/kg sampel). Hasil ini hampir sama dengan yang diperoleh dengan menggunakan metode analisis standar spektrofotometri UV-Vis (Tabel 5.8).

Tabel 5.8. Penentuan asam urat dalam berbagai jenis sayuran menggunakan metode standar (spektrofotometri) dan menggunakan biosensor. Angka adalah hasil rata-rata 3 kali pengukuran.

No	Nama Sampel	Berat sampel (g)	Analisis kadar asam urat menggunakan dua jenis metode analisis					
			Biosensor Elektrokimia ^a			Spektrofotometri UV-Vis ^b		
			mM	mg	mg/kg sampel	mM	mg	mg/kg sampel
1	Bayam hijau	0,0014	0,058	9,69	6,92	0,055	9,23	6,59
2	Kangkung	0,0014	0,025	4,27	3,05	ND	ND	ND
3	Brokoli	0,0015	0,942	158,39	105,60	0,933	156,83	104,56
4	Daun singkong	0,0013	0,019	3,20	2,47	0,018	3,08	2,37
5	Daun melinjo	0,0014	0,003	0,58	0,41	ND	ND	ND
6	Bayam merah	0,0017	0,038	6,36	3,74	ND	ND	ND
7	Bunga kol	0,0019	0,495	83,16	43,77	0,494	83,03	43,70
8	Apel	0,0015	1,925	323,66	215,77	1,921	322,89	215,26
9	Durian	0,0019	0,897	150,84	79,39	0,896	150,68	79,31
10	Alpukat	0,0015	1,524	256,13	170,75	1,518	255,24	170,16

^a Penentuan dilakukan pada potensial konstan $E=0,60$ V vs Ag/AgCl di dalam larutan buffer fosfat

^b Penentuan dilakukan menggunakan *o*-dianisidin pada $\lambda 520$ nm

Hasil analisis sampel dengan metode analisis yang dikembangkan dan metode analisis standar diketahui bahwa kadar asam urat di dalam semua sampel sayur-sayuran dapat dianalisis secara biosensor elektrokimia akan tetapi pada metode analisis spektrofotometri tidak dapat deteksi untuk sampel kangkung, daun melinjo dan bayam merah disebabkan oleh zat warna yang terkandung di dalam sampel sangat mengganggu pada deteksi spektrofotometri. Sementara untuk sampel buah-buahan diketahui bahwa kadar asam urat tertinggi terdapat pada buah apel (215,77 mg/kg sampel) disusul oleh buah alpukat (170,75 mg/kg sampel) dan buah durian (79,39 mg/kg sampel). Hasil analisis yang diperoleh dengan biosensor elektrokimia hampir sama dengan yang diperoleh dengan menggunakan metode analisis standar spektrofotometri UV-Vis.

5.2.8.2. Asam urat dalam kacang-kacangan

Selanjutnya dilakukan analisis kadar asam urat di dalam berbagai jenis kacang-kacangan dan kacang olahan (produk yang berasal dari kacang) yang dikonsumsi oleh masyarakat dan diperdagangkan secara luas di pasar tradisional dan modern di kota Medan seperti kacang tanah, kacang kedelai hitam, kacang kedelai, kacang hijau, kacang merah, kacang merah es, tempe dan tahu. Jenis kacang-kacangan ini masih terbatas karena ada berbagai jenis kacang lain yang belum tercakup, namun karena tidak dikonsumsi luas oleh masyarakat maka tidak diikutsertakan. Penentuan kadar asam urat di dalam beberapa jenis kacang-kacangan dan kacang olahan menggunakan metode analisis biosensor dan metode analisis standar spektrofotometri UV-Vis di rangkum pada Tabel 5.9.

Tabel 5.9. Penentuan asam urat dalam berbagai jenis sayuran menggunakan metode standar (spektrofotometri) dan menggunakan biosensor. Angka adalah hasil rata-rata 3 kali pengukuran.

No	Nama Sampel	Berat sampel (g)	Analisis Kadar Asam Urat di dalam sampel dengan Metode					
			Biosensor Elektrokimia			Spektrofotometri UV-Vis		
			mM	mg	mg/kg sampel	mM	mg	mg/kg sampel
1	Kacang tanah	0,0018	1,569	263,69	146,49	1,555	261,39	145,22
2	Kacang kedelai hitam	0,0012	0,790	132,83	110,70	ND	ND	ND
3	Kacang kedelai	0,0015	0,965	162,21	108,14	0,970	162,98	108,66
4	Kacang hijau	0,0013	0,058	9,69	7,45	0,055	9,23	7,10
5	Kacang merah	0,0011	0,064	10,76	9,78	0,055	9,23	8,39
6	Kacang merah es	0,0019	0,652	109,56	57,67	ND	ND	ND
7	Tempe	0,0013	1,715	288,25	221,73	1,701	285,99	219,99
8	Tahu	0,0018	1,244	209,06	116,14	1,226	206,04	114,47

Penentuan dilakukan pada potensial konstan $E=0,60$ V vs Ag/AgCl di dalam larutan buffer fosfat

Penentuan dilakukan menggunakan *o*-dianisidin pada $\lambda 520$ nm

Dari hasil analisis menggunakan biosensor elektrokimia diketahui bahwa kadar asam urat tertinggi terkandung pada kacang tanah (146,49 mg/kg sampel), disusul dengan kacang kedelai hitam (110,70 mg/kg sampel) dan kedelai (162,21 mg/kg sampel). Kadar asam urat di dalam kacang merah (9,78 mg/kg sampel) dan kacang hijau (7,45 mg/kg sampel) tergolong rendah. Hasil ini hampir sama dengan yang diperoleh dengan menggunakan metode analisis standar (Tabel 5.9), tetapi, beberapa sampel kacang-kacangan tidak dapat dianalisis secara spektrofotometri UV-Vis, yaitu Kacang kedelai hitam dan Kacang merah es. Lebih lanjut kadar asam urat di dalam makanan olahan yang berasal dari kacang-kacangan dianalisis seperti kacang merah es, tempe dan tahu. Dari hasil yang diperoleh dapat disimpulkan bahwa tempe memiliki kadar asam urat tertinggi (221,73 mg/kg sampel), sementara pada tahu (116,14 mg/kg sampel), dan pada kacang merah es (57,67 mg/kg sampel). Hal ini mungkin disebabkan oleh semakin meningkatnya protein di dalam kacang olahan. Oleh karena itu, diharapkan kepada masyarakat, khususnya yang perlu mengurangi jumlah kadar asam urat di dalam tubuh untuk lebih berhati-hati dalam mengkonsumsi dan memilih makanan khususnya makanan yang mengandung protein (purin) yang tinggi.

5.2.8.3. Asam urat dalam makanan kaleng

Penentuan kadar asam urat di dalam sampel makanan kaleng juga dilakukan untuk memberikan informasi terhadap kualitas makanan kaleng (daging dan ikan) yang diduga mengandung asam urat. Berbagai jenis makanan kaleng yang dikonsumsi oleh masyarakat dan diperdagangkan secara luas di pasar tradisional dan modern di kota Medan seperti

daging sapi, ikan makarel dan ikan sarden berbagai merek dagang dianalisis menggunakan biosensor dan standar spektrofotometri UV-Vis. Hasil analisis kadar asam urat di dalam berbagai jenis makanan kaleng dengan merek dagang berbeda-beda menggunakan biosensor dan metode standar di rangkum pada Tabel 5.10.

Tabel 5.10. Penentuan asam urat dalam berbagai jenis makanan kaleng menggunakan metode standar (spektrofotometri) dan menggunakan biosensor. Angka adalah hasil rata-rata 3 kali pengukuran.

No	Nama Sampel	Berat sampel (g)	Analisis Kadar Asam Urat di dalam sampel dengan Metode					
			Biosensor Elektrokimia			Spektrofotometri UV-Vis		
			mM	mg	mg/kg sampel	mM	mg	mg/kg sampel
1	Daging sapi kaleng A1	0,0017	2,515	422,77	248,69	2,470	415,15	244,21
2	Daging sapi kaleng A2	0,0018	1,718	288,80	160,45	1,701	285,99	158,88
3	Ikan makarel B1	0,0015	0,123	20,75	13,84	0,128	21,53	14,35
4	Ikan makarel B2	0,0017	0,137	23,04	13,55	0,128	21,53	12,66
5	Ikan makarel B3	0,0017	3,027	508,91	299,36	2,982	501,25	294,86
6	Ikan makarel B4	0,0013	0,134	22,55	17,35	0,128	21,53	16,56
7	Ikan makarel B5	0,0018	0,043	7,29	4,05	0,384	64,58	35,88
8	Ikan sarden C1	0,0015	0,088	14,73	9,82	ND	ND	ND
9	Ikan sarden C2	0,0018	1,052	176,78	98,21	1,006	169,14	93,96
10	Ikan sarden C3	0,0016	0,299	50,20	31,38	ND	ND	ND
11	Ikan sarden C4	0,0014	2,479	416,66	297,62	2,433	409,00	292,14
12	Ikan sarden C5	0,0017	2,488	418,19	245,99	2,470	415,15	244,21

Penentuan dilakukan pada potensial konstan $E=0,60$ V vs Ag/AgCl di dalam larutan buffer fosfat

Penentuan dilakukan menggunakan *o*-dianisidin pada $\lambda 520$ nm

Biosensor elektrokimia telah dipergunakan untuk menentukan kadar asam urat di dalam sampel makanan kaleng dan diketahui bahwa kadar asam urat untuk daging sapi dengan merek dagang yang berbeda sangat bervariasi, yaitu berada pada (248,69 mg/kg sampel) dan (160,45 mg/kg sampel). Kadar asam urat di dalam ikan kaleng seperti ikan makarel dan ikan sarden juga bervariasi pada merek dagang yang berbeda. Ada jenis ikan makarel yang memiliki kadar asam urat sangat tinggi pada merek dagang (B3) yaitu 299,36 mg/kg sampel, sedangkan jenis ikan yang sama dengan merek dagang berbeda yaitu B1 (13,84 mg/kg sampel), B2 (13,55 mg/kg sampel), B4 (17,35 mg/kg sampel), dan paling rendah pada B5 (4,05 mg/kg sampel). Pola yang sama juga diperoleh kadar asam urat bervariasi untuk jenis ikan sarden dengan merek dagang berbeda, yaitu pada ikan sarden merek dagang C4 (297,62 mg/kg sampel) dan C5 (245,99 mg/kg sampel) tergolong tinggi, sedangkan untuk merek dagang C2 (98,21 mg/kg sampel), C3 (31,38 mg/kg sampel), dan paling rendah pada C1 (9,82 mg/kg sampel). Hasil ini hampir sama dengan yang diperoleh dengan menggunakan metode analisis standar (Tabel 5.10). Beberapa sampel ikan kaleng

pada merek dagang C1 dan C3 tidak dapat dianalisis secara spektrofotometri UV-Vis, kemungkinan disebabkan adanya senyawa yang ditambahkan sebagai bahan pengisi atau pengawet di dalam sampel yang mengganggu terhadap deteksi spektrofotometri.

5.2.8.4. Asam urat dalam daging segar

Daging menjadi konsumsi yang umum bagi masyarakat sehingga perlu diketahui kadar asam urat yang terkandung di dalamnya agar masyarakat dapat memberikan keputusan kebutuhan daging yang diperlukannya sesuai dengan kondisi dietnya. Penentuan kadar asam urat di dalam sampel daging segar juga dilakukan untuk memberikan informasi terhadap kualitas daging segar yang diduga mengandung asam urat. Hasil analisis kadar asam urat di dalam berbagai jenis daging segar menggunakan biosensor dan metode standar dirangkum pada Tabel 5.11.

Tabel 5.11. Penentuan asam urat dalam berbagai jenis daging segar menggunakan metode standar (spektrofotometri) dan menggunakan biosensor. Angka adalah hasil rata-rata 3 kali pengukuran.

No	Nama Sampel	Berat sampel (g)	Analisis Kadar Asam Urat di dalam sampel denan Metode					
			Biosensor Elektrokimia			Spektrofotometri UV-Vis		
			mM	mg	mg/kg sampel	mM	mg	mg/kg sampel
1	Daging sapi	0,0019	3,173	533,48	280,78	3,128	525,86	276,77
2	Jantung Sapi	0,0019	2,487	418,11	220,06	2,396	402,85	212,03
3	Hati sapi	0,0019	0,903	151,74	79,86	0,823	138,38	72,83
4	Usus sapi	0,0014	0,356	59,82	42,73	0,348	58,43	41,73
5	Daging kambing	0,0019	3,575	601,08	316,36	3,494	587,36	309,14
6	Jantung kambing	0,0013	1,216	204,48	157,29	1,189	199,89	153,76
7	Ginjal kambing	0,0012	1,527	256,74	213,95	1,482	249,09	207,57
8	Limfa Kambing	0,0019	3,329	559,65	294,55	3,311	556,61	292,95
9	Usus Kambing	0,0014	0,148	24,84	17,74	0,128	21,53	15,38
10	Hati Kambing	0,0012	0,397	66,68	55,57	0,348	58,43	48,69
11	Daging ayam	0,0015	1,161	195,25	130,16	1,116	187,59	125,06
12	Jantung ayam	0,0015	1,122	188,61	125,74	ND	ND	ND
14	Rempelo ayam	0,0018	2,579	433,53	240,85	2,543	427,45	237,47
14	Hati ayam	0,0019	0,210	35,33	18,59	0,165	27,68	14,57
15	Usus ayam	0,0012	0,446	74,92	62,44	0,384	64,58	53,82
16	Daging Kelinci	0,0016	0,865	145,37	90,86	0,823	138,38	86,49
17	Jantung kelinci	0,0014	2,263	380,35	271,68	2,213	372,10	265,78
18	Usus kelinci	0,0015	0,708	119,10	79,40	0,677	113,78	75,85
19	Hati kelinci	0,0016	1,057	177,77	111,11	0,604	101,48	63,43
20	Limfa kelinci	0,0017	2,148	361,04	212,38	1,921	322,89	189,94
21	Ginjal kelinci	0,0015	0,819	137,72	91,81	ND	ND	ND

* Penentuan dilakukan pada potensial konstan $E=0,60$ V vs Ag/AgCl di dalam larutan buffer fosfat

* Penentuan dilakukan menggunakan *o*-dianisidin pada $\lambda 520$ nm

Berbagai jenis bagian daging yang dikonsumsi oleh masyarakat dan diperdagangkan secara luas di pasar tradisional dan modern di kota Medan seperti daging sapi (otot,

jantung, hati, dan usus), daging kambing (otot, jantung, ginjal, limfa, usus, dan hati), daging ayam (otot, jantung, ampelo, hati, dan usus), daging kelinci (otot, jantung, usus, hati, limfa dan ginjal) dianalisis menggunakan biosensor dan standar spektrofotometri UV-Vis. Dari hasil analisis secara biosensor elektrokimia diketahui bahwa kadar asam urat di dalam berbagai jenis daging segar juga bervariasi, dan bagian daging segar yang berbeda juga mengandung kadar asam urat yang berbeda-beda.

Hasil analisis secara biosensor dan metode spektrofotometri menunjukkan bahwa bagian otot daging sapi (280,78 mg/kg sampel), daging kambing (316,36 mg/kg sampel), daging ayam (130,16 mg/kg sampel), tergolong tinggi sedangkan otot daging kelinci (90,86 mg/kg sampel) lebih rendah dari otot daging segar yang lainnya. Untuk bagian hati, seperti hati sapi (79,86 mg/kg sampel), hati kambing (55,57 mg/kg sampel), hati ayam (18,59 mg/kg sampel), hati kelinci (111,11 mg/kg sampel) tergolong rendah, yaitu jauh lebih rendah dibanding bagian otot daging segar. Pola yang sama juga ditemukan untuk bagian organ yang lain seperti usus sapi (42,73 mg/kg sampel), usus kambing (17,74 mg/kg sampel), usus ayam (62,44 mg/kg sampel), usus kelinci (79,40 mg/kg sampel) juga memiliki kadar asam urat yang tergolong rendah dibanding bagian organ otot, sedangkan untuk bagian jantung, ginjal dan limfa untuk semua daging segar memiliki kadar asam urat yang tergolong tinggi, yaitu pada bagian jantung berada pada 125,74 mg/kg sampel sampai 271,68 mg/kg sampel, dan pada bagian ginjal berada pada 91,81 mg/kg sampel sampai 213,95 mg/kg sampel, sementara pada bagian limfa berada pada 212,38 mg/kg sampel sampai 294,55 mg/kg sampel. Dari informasi kadar asam urat ini dapat diketahui bahwa bagian organ daging yang berbeda untuk jenis ternak yang berbeda memiliki kadar asam urat yang berbeda juga.

5.2.8.5. Asam urat dalam ikan segar

Ikan segar sudah termasuk konsumsi sebagian besar masyarakat di Indonesia sehingga mengetahui kadar asam urat yang terkandung di dalam ikan segar sangat penting, terutama bagi mereka yang memerlukan diet terhadap asam urat yang disebabkan oleh berbagai jenis penyakit yang diderita atau potensi penyakit yang mungkin timbul oleh konsumsi makanan yang mengandung asam urat. Penentuan kadar asam urat di dalam sampel ikan segar juga dilakukan untuk memberikan informasi terhadap kualitas ikan segar yang diduga mengandung asam urat. Berbagai jenis ikan air tawar dan air laut yang dikonsumsi oleh masyarakat dan diperdagangkan secara luas di pasar tradisional dan modern di kota Medan seperti ikan laut (dencis, tongkol, selar, teri, udang, udang lobster, kerang, cumi-cumi, kepiting) dan ikan air tawar (belut, mujahir, ikan mas dan bandeng)

dianalisis menggunakan biosensor elektrokimia dan metode standar spektrofotometri UV-Vis. Hasil analisis kadar asam urat di dalam berbagai jenis ikan segar menggunakan biosensor dan metode standar di rangkum pada Tabel 5.12.

Tabel 5.12. Penentuan asam urat dalam berbagai jenis ikan segar menggunakan metode standar (spektrofotometri) dan menggunakan biosensor. Angka adalah hasil rata-rata 3 kali pengukuran.

No	Nama Sampel	Berat sampel (g)	Analisis Kadar Asam Urat di dalam sampel dengan Metode					
			Biosensor Elektrokimia			Spektrofotometri UV-Vis		
			mM	mg	mg/kg sampel	mM	mg	mg/kg sampel
1	Udang biasa	0,0012	0,132	22,12	18,44	0,128	21,53	17,94
2	Udang lobster	0,0018	2,487	418,11	232,29	2,396	402,85	223,80
3	Kerang	0,0018	3,153	530,12	294,51	2,762	464,35	257,97
4	Cumi-cumi	0,0019	2,121	356,62	187,69	2,030	341,35	179,66
5	Kepiting	0,0019	0,698	117,38	61,78	0,640	107,63	56,65
6	Belut	0,0013	0,635	106,68	82,06	0,457	76,88	59,14
7	Dencis	0,0017	0,547	92,03	54,14	0,494	83,03	48,84
8	Mujahir	0,0012	1,780	299,20	249,33	1,555	261,39	217,83
9	Selar	0,0015	1,775	298,40	198,93	1,774	298,29	198,86
10	Tongkol	0,0018	1,161	195,25	108,47	1,116	187,59	104,21
11	Bandeng	0,0016	1,573	264,37	165,23	1,482	249,09	155,68
12	Teri	0,0014	1,079	181,36	129,54	1,043	175,29	125,20
13	Ikan mas	0,0017	0,171	28,76	16,92	ND	ND	ND

Penentuan dilakukan pada potensial konstan $E=0,60$ V vs Ag/AgCl di dalam larutan buffer fosfat

Penentuan dilakukan menggunakan α -dianisidin pada $\lambda 520$ nm

Hasil analisis terhadap sampel ikan segar menggunakan biosensor elektrokimia diketahui bahwa kadar asam urat di dalam berbagai jenis ikan, diurutkan dari yang paling tinggi yaitu kerang (294,51 mg/kg sampel), disusul ikan mujahir (249,33 mg/kg sampel), dan udang lobster (232,29 mg/kg sampel), ketiganya tergolong mengandung kadar asam urat tinggi, sedangkan jenis ikan lainnya mengandung kadar asam urat yang tergolong tinggi adalah ikan selar (198,93 mg/kg sampel), cumi-cumi (187,69 mg/kg sampel), ikan bandeng (165,23 mg/kg sampel), ikan teri (129,54 mg/kg sampel), ikan belut (82,06 mg/kg sampel), kepiting (61,78 mg/kg sampel), dan ikan dencis (54,14 mg/kg sampel). Berbagai jenis ikan lain yang memiliki kadar asam urat rendah adalah ikan mas (16,92 mg/kg sampel) dan udang biasa (18,44 mg/kg sampel). Hasil analisis biosensor hampir sama dengan yang diperoleh dengan menggunakan metode analisis spektrofotometri (Tabel 5.12).

5.2.9. Kelebihan Biosensor Asam Urat

Metode analisis biosensor asam urat yang dikembangkan dalam penelitian ini memiliki beberapa kelebihan bila dibandingkan dengan metode standar spektrofotometri.

Metode analisis biosensor memiliki sensitifitas tinggi, yaitu dapat menentukan asam urat di dalam sampel pada konsentrasi sangat rendah 0,1 mM asam urat sehingga hampir semua sampel yang dianalisis dapat dideteksi menggunakan biosensor sedangkan dengan metode spektrofotometri beberapa sampel tidak terdeteksi disebabkan keterbatasan dalam warna sampel dan batas deteksi yang belum mencukupi untuk analisis. Metode analisis biosensor asam urat mempunyai kecepatan analisis tinggi, yaitu apabila sistem elektrokimia telah terpasang maka hanya dibutuhkan waktu 1 menit untuk menentukan kadar asam urat di dalam satu sampel, sementara dengan metode spektrofotometri membutuhkan waktu paling sedikit 30 menit per sampel karena menggunakan langkah analisis yang sangat kompleks. Langkah analisis biosensor asam urat juga tidak rumit (sederhana), yaitu penentuan asam urat dilakukan tanpa perlakuan sampel kecuali pengenceran untuk sampel yang mengandung asam urat tinggi. Metode analisis biosensor asam urat memiliki akurasi yang sangat baik, yaitu telah terbukti bahwa hasil analisis dengan menggunakan biosensor mempunyai hasil pengukuran (kadar) hampir sama dengan kadar asam urat yang sebenarnya di dalam sampel. Di samping itu, biosensor asam urat dapat dipergunakan dalam jangka waktu cukup lama karena memiliki kestabilan yang tinggi pada penggunaan rutin. Biosensor asam urat dapat disimpan dalam keadaan kering pada suhu kamar sehingga memudahkan dalam pendistribusian bila diproduksi secara massal.

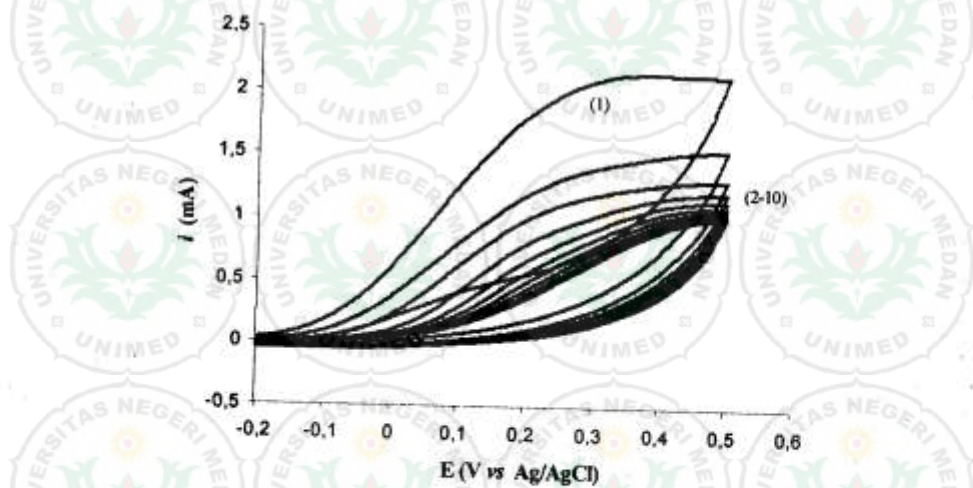
5.3. Hasil Biosensor Elektrokimia Menggunakan Strip Biosensor

Dari hasil penelitian tahun ketiga yaitu pengembangan biosensor elektrokimia menggunakan strip biosensor diperoleh temuan-temuan tentang pembuatan dan pengembangan strip biosensor yang dapat dipergunakan untuk penentuan asam urat di dalam sampel makanan dan minuman. Hasil temuan secara biosensor juga dibandingkan dengan hasil analisis biosensor dengan menggunakan spektrofotometri untuk analisis berbagai jenis sampel makanan dan minuman. Hasil dan temuan dijelaskan secara terintegrasi berikut ini.

5.3.1. Elektropolimerisasi Polityramin Pada Strip Biosensor

Pembuatan polimer polityramin yang diperlukan sebagai matriks untuk immobilisasi enzim di dalam strip biosensor dilakukan sama seperti pada pembuatan matriks polimer pada biosensor elektrokimia yang dijelaskan pada Tahun ke-2 (Pembahasan 5.2.1). Matriks polimer yang dibutuhkan adalah polityramin yang juga dibuat secara elektrodposisi secara siklik voltametry pada -0,20 V dan +1.50 V *versus* Ag/AgCl sampai terbentuk polityramin pada permukaan elektroda strip yang dipergunakan sebagai elektroda kerja. Oksidasi

polityramin pada elektroda strip sedikit berbeda dengan oksidasi polityramin pada elektroda strip, yaitu arus oksidasi meningkat pada potensial +0.0 V vs Ag/AgCl sebagai pertanda terjadinya reaksi oksidasi tyramin membentuk polityramin dan arus puncak diperoleh pada potensial +0.30 V vs Ag/AgCl. Sama seperti proses polimerisasi yang terjadi pada elektroda disk, maka polimerisasi pada elektroda strip terlihat bahwa arus oksidasi pada elektropolimerisasi berikutnya menjadi berkurang sebagai pertanda bahwa polityramin adalah senyawa nonkonduktor, sehingga pada polimerisasi berikutnya seluruh permukaan elektroda telah tertutup dengan polimer yang mengandung enzim (enzim terikat secara fisik pada polimer). Bentuk siklik voltamogram (CV) untuk elektropolimerisasi tyramin pada permukaan elektroda strip biosensor sebanyak 10 sweep cycle diperlihatkan pada Gambar 5.20.



Gambar 5.20. Voltammogram CV untuk elektrodposisi polityramin pada elektroda strip pada 0.50 V s^{-1} pada $0,1 \text{ M}$ tyramin dilarutkan dalam buffer fosfat yang mengandung enzim. Elektrodposisi dilakukan pada 0.00 V dan $+1.65 \text{ V}$ versus Ag/AgCl sebanyak 10 sweep cycle.

Matriks polimer polityramin yang terbentuk pada permukaan elektroda juga transparan dan terikat kuat sehingga sangat ideal untuk dipergunakan sebagai matriks untuk mengikat enzim urikase (UOx) pada permukaan elektroda kerja. Polimerisasi terjadi pada posisi *ortho*, sama seperti pada elektropolimerisasi senyawa fenol (Pham, *dkk.* 1984), dimana senyawa terikat satu dengan yang lain pada gugus OH membentuk polimer sementara senyawa amin tidak mengalami perubahan (Situmorang, *dkk.* 1998). Dengan tersedianya gugus amin dalam polkimer maka gugus ini dipergunakan untuk berikatan dengan gugus karboksilat yang terdapat pada enzim urikase sehingga berikatan secara kovalen menggunakan EDC/NHS. Penggunaan matriks polityramin dan pengikatan

menggunakan EDC/NHS dalam membuat strip biosensor untuk penentuan asam urat menjadikan enzim sebagai bahan aktif dalam biosensor dapat dipergunakan secara berulang-ulang.

Disain elektroda enzim asam urat yang dikembangkan diperlihatkan pada Gambar 5.21, terdiri atas enzim yang diimmobilisasi pada matriks polityramin yang menempel pada elektroda strip. Lapisan membran polityramin yang mengandung enzim urikase yang menempel pada permukaan elektroda strip adalah enzim terimmobilisasi berupa lapisan tipis. Dalam studi ini berbagai jenis strip biosensor telah didisain dengan menggunakan deteksi potensiometri dan deteksi amperometri. Akan tetapi, dalam deteksi potensiometri tidak memberikan hasil yang reproduisible disebabkan oleh sulitnya menjaga kondisi redoks mediator $K_4Fe(CN)_6$ yang stabil sehingga hasil penelitian tidak memberikan hasil pengukuran yang konstan, hanya dalam deteksi amperometri yang ditampilkan dalam hasil penelitian ini.



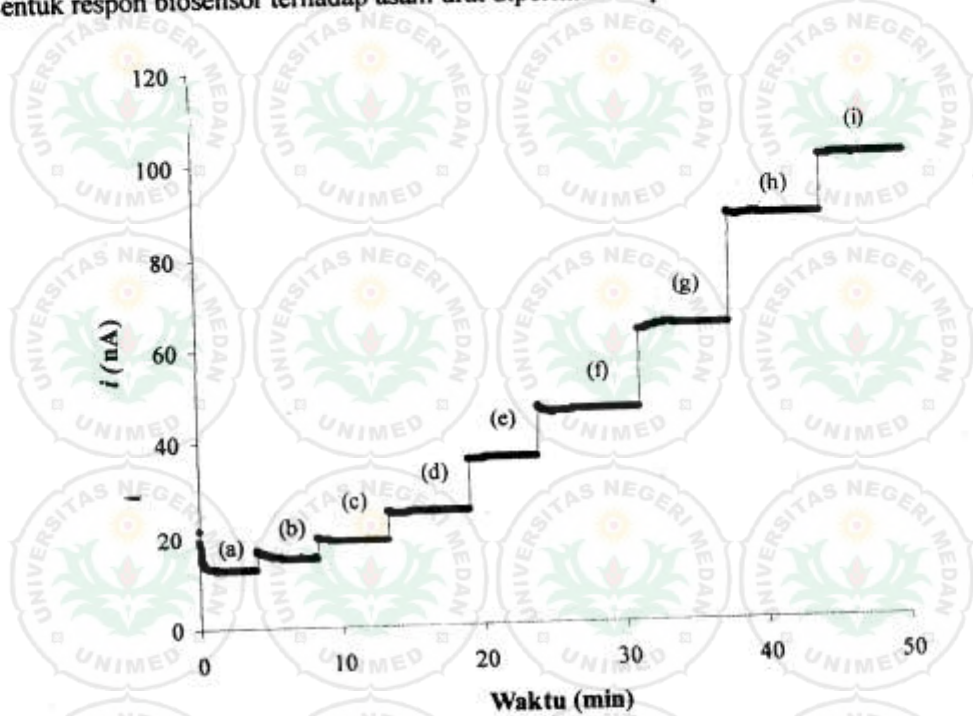
Gambar 5.21. Skema elektroda strip biosensor untuk penentuan asam urat dengan immobilisasi enzim urikase pada matriks polityramin pada permukaan elektroda karbon gelas terplatinasi (GC/Pt): (a) Strip Biosensor A, (b) Strip Biosensor B, (c) Strip Biosensor C, (d) Strip Biosensor D, dan (e) Interface Potentiostat dan Strip Biosensor.

Secara singkat dijelaskan variasi strip biosensor yang didisain di dalam penelitian ini, yaitu (1) Strip Biosensor A (gambar 5.21a) adalah elektroda yang dilengkapi dengan elektroda tanpa melapisi matriks polityramin dengan materi lain, (2) Strip Biosensor B (gambar 5.21b) adalah elektroda yang dilengkapi dengan elektroda dengan melapisi dengan nilon untuk mendukung matriks polityramin, (3) Strip Biosensor C (gambar 5.21c) adalah elektroda yang dilengkapi dengan elektroda dengan melapisi dengan membran untuk mendukung matriks polityramin, dan (4) Strip Biosensor D (gambar 5.21d) adalah elektroda yang dilengkapi dengan elektroda dengan melapisi elektroda dengan polimer lain untuk menyokong matriks polityramin. Selanjutnya berbagai jenis strip biosensor ini

dicobakan dan diperoleh respon yang lebih baik dan dengan sensitivitas yang baik dengan menggunakan Strip Biosensor Tipe A, maka selanjutnya strip biosensor yang dikembangkan adalah Strip Biosensor A yang dipergunakan dalam studi lanjutan, dirangkai dengan deteksi elektrokimia seperti diperlihatkan pada gambar 5.21e.

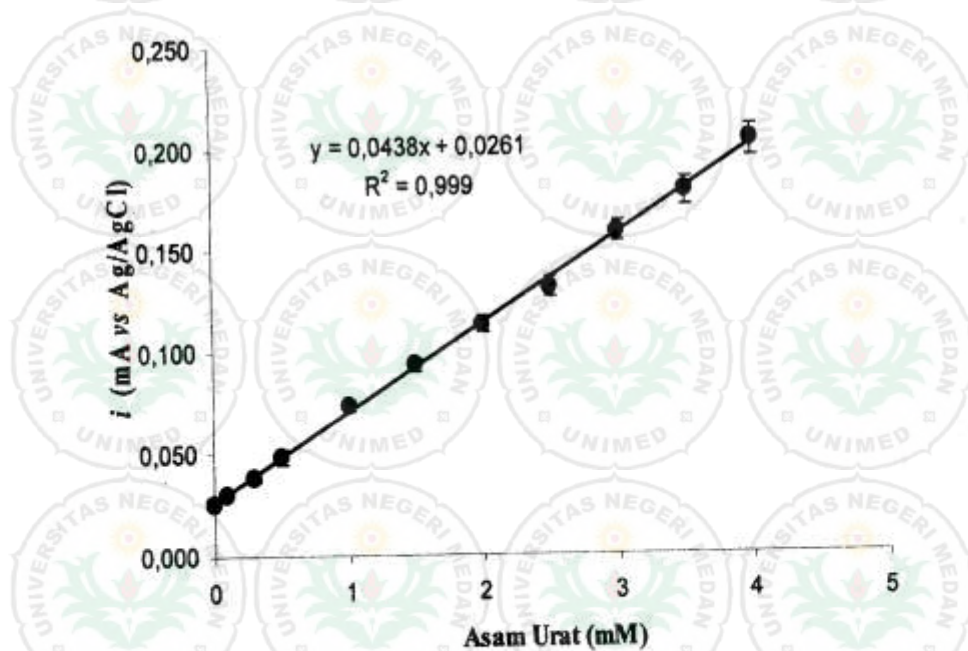
5.3.2. Respon Strip Biosensor Terhadap Asam Urat

Strip biosensor asam urat yang dibuat melalui immobilisasi enzim urat oksidase atau urikase, E.C 1.7.3.3 (UOx) pada matriks polityramin menghasilkan enzim elektroda asam urat (GC/Pt/PTy/UOx), selanjutnya disebut sebagai Strip biosensor. Strip biosensor diuji responya terhadap asam urat, yaitu menggunakan larutan asam urat standar yang dilarutkan di dalam larutan 4% Li_2CO_3 . Respon biosensor terhadap analit dilakukan berdasarkan besarnya arus yang terdapat pada sel elektrokimia yang berasal dari reaksi oksidasi analit oleh adanya katalis enzim yang diimmobilisasi pada permukaan elektroda. Arus yang dihasilkan dalam reaksi enzimasi dideteksi secara amperometri dalam sel elektrokimia. Bentuk respon biosensor terhadap asam urat diperlihatkan pada Gambar 5.22.



Gambar 5.22. Respon strip biosensor terhadap larutan standard asam urat, berturut-turut: (a) 0,0 mM, (b) 0,1 mM, (c) 0,3 mM, (d) 0,5 mM, (e) 1,0 mM, (f) 1,5 mM, (g) 2,5 mM, (h) 3,5 mM, dan (i) 4,0 mM asam urat. Analisis dilakukan pada potensial konstan 0,6 V vs Ag/AgCl di dalam buffer foasfat (0,01 M, pH 6,0). Matriks polityramin dibuat dibuat secara CV sebanyak 10 sweep cycle seperti pada prosedur percobaan pada Gambar 5.20.

Dalam deteksi menggunakan strip biosensor, arus yang terbentuk dalam sistem elektrokimia berasal dari hidrogen peroksida yang dihasilkan dari reaksi enzimasi antara asam urat dengan katalisasi enzim urikase yang diimobilisasi pada permukaan strip biosensor. Dari bentuk respon strip biosensor yang diperlihatkan pada Gambar 5.22 diketahui bahwa semakin meningkat konsentrasi asam urat yang ditambahkan ke dalam strip biosensor, maka arus yang terbentuk juga akan semakin meningkat sebagaimana diperlihatkan pada Gambar 5.22a – 5.22i. Hasil ini meyakinkan bahwa respon strip biosensor terhadap asam urat adalah setara dengan konsentrasi asam urat yang terkandung di dalam larutan.



Gambar 5.23. Kurva kalibrasi larutan standar asam urat yang dianalisis menggunakan biosensor asam urat (GC/Pt/PTy/UOx), yaitu rata-rata dari 5 elektroda kerja seperti pada respon elektroda pada Gambar 5.22. Prosedur pembuatan elektroda dilakukan sama seperti pada Gambar 5.20.

Kurva kalibrasi respon strip biosensor terhadap larutan standar asam urat diperlihatkan pada Gambar 5.23, yaitu merupakan hasil rata-rata kurva kalibrasi dari 6 buah strip biosensor. Dari kurva kalibrasi terlihat bahwa biosensor asam urat memberikan respon yang sensitif terhadap asam urat, slop $0,044 \mu\text{A}/\text{mM}$ asam urat. Sensitivitas strip biosensor (slop $0,044 \mu\text{A}/\text{mM}$ asam urat) lebih rendah bila dibandingkan terhadap sensitivitas biosensor dengan menggunakan elektroda disk (slop $0,066 \mu\text{A}/\text{mM}$ asam urat). Akan tetapi, bila dilihat dari tingkat linearitas deteksi terdapat peningkatan skala linearitas strip biosensor asam urat berada pada $0,1 - 4,0 \text{ mM}$ asam urat, yaitu sudah mencukupi untuk

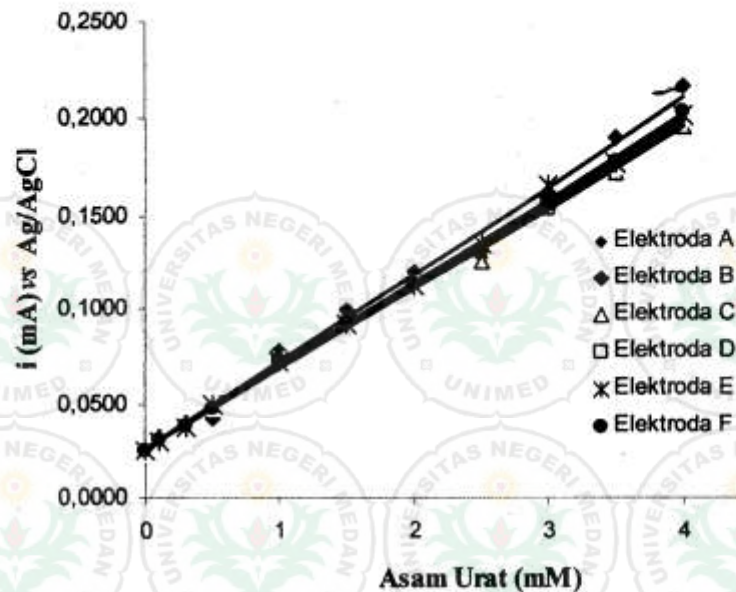
dipergunakan pada analisis asam urat yang terdapat di dalam sampel makanan dan minuman yang mengandung asam urat, karena diduga kebanyakan sampel makanan dan minuman yang dianalisis berada pada skala linearitas strip biosensor, hanya beberapa sampel yang mengandung kadar asam urat di bawah skala linearitas sehingga untuk sampel yang berada di bawah skala konsentrasi ini akan dilakukan pemekatan sampel dalam analisis asam urat sehingga dapat dianalisis menggunakan skala linearitas strip biosensor.

5.3.3. Kondisi Optimum Strip Biosensor Asam Urat

Untuk mendapatkan respon elektroda yang optimum terhadap penentuan asam urat, dilakukan optimasi strip biosensor untuk beberapa parameter yang diduga sedikit berbeda dibanding dengan biosensor elektrokimia di dalam disk. Parameter-parameter tersebut diantaranya adalah keterulangan strip biosensor dan studi stabilitas biosensor. Beberapa parameter percobaan yang lain dianggap hampir sama dengan parameter optimum yang diperoleh pada hasil percobaan yang diperoleh pada tahun ke-2 dengan menggunakan elektroda disk.

5.3.3.1. Keterulangan Strip Biosensor Asam Urat

Keterulangan strip biosensor dipelajari agar biosensor asam urat dapat diyakinkan penggunaannya maka dilakukan studi keterulangan strip biosensor, yaitu dengan cara membuat strip biosensor asam urat dengan prosedur yang sama, akan tetapi menggunakan larutan (stok) yang berbeda dan pada waktu yang berbeda pula. Enam buah strip biosensor dibuat pada waktu yang berlainan, kemudian dipergunakan untuk penentuan asam urat standar. Keterulangan strip biosensor diperlihatkan dari kurva kalibrasi larutan standar asam urat yang dianalisis, dan hasil pengukuran untuk masing-masing biosensor diperlihatkan pada Gambar 5.24. Dari hasil studi keterulangan strip biosensor terlihat bahwa strip biosensor asam urat memiliki tingkat keterulangan tinggi, yaitu strip biosensor yang dibuat pada waktu yang berbeda dengan prosedur yang sama menghasilkan respon yang hampir sama, diperlihatkan dari hasil rata-rata untuk enam buah strip biosensor, koefisien variasi pada konsentrasi rendah ($CV=0,001$), dan koefisien variasi pada konsentrasi tinggi ($CV=0,008$). Hasil ini sangat menggembirakan, dimana metode analisis dengan keterulangan pada koefisien variasi sampai ($CV=16$) masih diperbolehkan untuk analisis secara elektrokimia. Dengan demikian, strip biosensor yang dikembangkan dalam studi ini sudah memenuhi syarat dalam hal tingkat kepercayaan analisis untuk penentuan analit secara elektrokimia sehingga sudah layak untuk dipergunakan pada penentuan asam urat di dalam sampel makanan dan minuman.

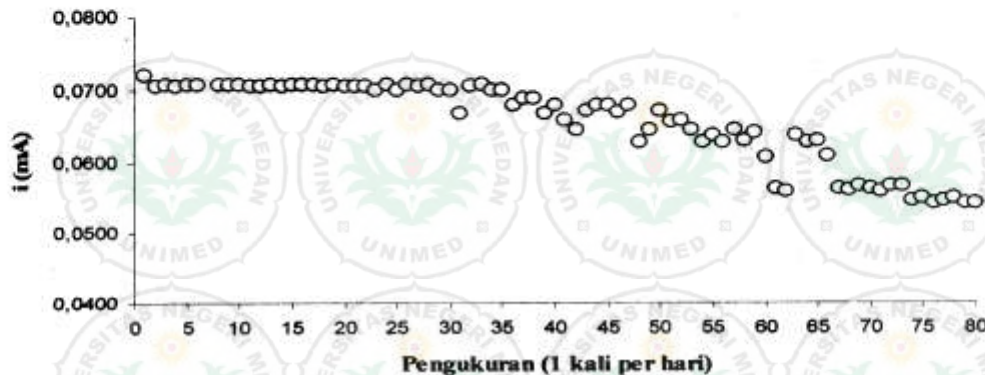


Gambar 5.24. Keterangan strip biosensor asam urat: enam buah biosensor dibuat pada waktu yang berbeda dari larutan stok berbeda, tetapi menggunakan prosedur sama. Prosedur pembuatan biosensor dan analisis sampel dilakukan sama seperti pada Gambar 5.3.

5.3.3.2. Stabilitas Strip Biosensor Asam Urat

Stabilitas strip biosensor dilakukan untuk meyakinkan potensi strip biosensor asam urat untuk penentuan asam urat di dalam sampel makanan dan minuman. Studi stabilitas strip biosensor bertujuan untuk mengetahui tingkat stabilitas biosensor untuk pemakaian berulang-ulang dalam jangka waktu yang lama, yaitu selama 88 hari dengan penggunaan 80 kali pengukuran. Hasil pengukuran terhadap larutan standar 1 mM asam urat dilakukan dengan menggunakan strip biosensor berdasarkan pemakaian berulang-ulang selama 80 kali analisis dan dilakukan setiap hari kerja (kecuali Minggu dan libur) diperlihatkan pada Gambar 5.25. Dengan penggunaan yang rutin pada jangka waktu lama terlihat bahwa strip biosensor asam urat menunjukkan stabilitas yang cukup baik sampai pada pemakaian 38 hari, kemudian menunjukkan penurunan sensitivitas sebanyak 3% setelah dipergunakan secara rutin selama 49 hari, dan penurunan sensitivitas secara perlahan terjadi, yaitu penurunan respon sebanyak sekitar 10% setelah pemakaian 52 hari. Penurunan sensitivitas yang cukup besar terjadi pada strip biosensor setelah dipergunakan selama 68 hari, yaitu sekitar 22%, dan dilanjutkan pada penurunan sensitivitas sebesar 55% setelah dipergunakan selama 72 hari. Dari hasil ini terlihat bahwa strip biosensor asam urat yang disimpan dalam keadaan kering pada suhu kamar atau pada suhu 4 °C menunjukkan stabilitas yang baik. Hasil ini hampir sama dengan hasil yang diperoleh pada studi

sebelumnya tentang stabilitas biosensor untuk jenis biosensor asam urat yang sama dengan menggunakan elektroda disk yang telah didiskusikan pada pembahasan stabilitas biosensor asam urat (Pembahasan 5.2.5).



Gambar 5.25. Stabilitas strip biosensor asam urat berdasarkan penggunaan secara berulang-ulang untuk penentuan 1 mM asam urat standar selama 80 kali analisis. Strip biosensor selalu disimpan dalam keadaan kering pada suhu kamar bila tidak dipergunakan. Prosedur pembuatan biosensor dan analisis sampel dilakukan sama seperti pada Gambar 5.20.

5.3.4. Perlakuan sampel dan Analisis Sampel Makanan dan Minuman

Perlakuan sampel untuk analisis sampel makanan dan minuman dilakukan terhadap berbagai jenis bahan baku makanan yang tergolong sebagai bahan baku padatan dan cairan. Setelah perlakuan sampel maka selanjutnya dilakukan analisis menggunakan metode analisis yang dikembangkan dalam studi ini. Sampel makanan dan minuman disampling oleh mahasiswa secara acak dari berbagai pasar tradisional dan supermarket di kota Medan, dengan asumsi bahwa sampel yang diambil diduga mengandung asam urat dan menjadi konsumsi masyarakat. Sampel padat diambil langsung dari sampel (raw material) dan menimbangya, sedangkan sampel cairan dipipet sebanyak 100 mL dan menimbangya, kemudian masing-masing sampel dikeringkan di dalam oven pada suhu 60 °C selama 7 hari sampai diperoleh sampel kering seperti yang diperlihatkan pada Gambar 5.26a dan Gambar 5.26b. Sampel yang sudah kering berbentuk padat kemudian ditimbang massa untuk memperoleh berat kering dan randemennya seperti dirangkum pada Tabel 5.13 dan Tabel 5.14. Sampel makanan dan minuman yang sudah kering kemudian digerus sampai halus dan disimpan dalam botol sampel yang telah diberi tanda masing-masing setiap sampel Gambar 5.26c. Sampel ini selanjutnya dipergunakan sebagai sampel stok untuk analisis asam urat. Sampel yang sudah halus selanjutnya disimpan di dalam lemari es pada suhu 4°C bila tidak dipergunakan.



Gambar 5.26 Bentuk sampel makanan dan minuman (a) berwujud padat dan (b) berwujud cair yang dikeringkan sampai (c) sampel berbentuk tepung yang siap untuk dilarutkan untuk penentuan asam urat di dalam sampel makanan dan minuman.

Berbagai jenis bahan makanan yang berwujud padat dalam keadaan mentah (raw materil) dijadikan sebagai sampel. Sampel ini dikelompokkan sebagai bagian daging seperti: kulit sapi, daging sapi, usus sapi, hati sapi, kulit kambing, daging kambing, usus kambing, hati kambing, kulit kelinci, daging kelinci, usus kelinci, hati kelinci, kulit ayam, daging ayam, usus ayam, dan hati ayam. Berbagai jenis ikan laut dan ikan air tawar juga dijadikan sebagai sample seperti: kerang, cumi-cumi, udang lobster, udang, kepiting, tongkol, dencis, selar, gembung, mujair, ikan mas, lele, gabus, belut, nila, teri, dan ikan asin. Bahan baku makanan berupa kacang-kacangan seperti kacang tanah juga dijadikan sebagai sample untuk penentuan asam urat. pari, kacang merah, kacang hijau, kacang putih, kacang kedelai, dan kacang tanah juga dijadikan sebagai sample untuk penentuan asam urat. Selanjutnya bahan makanan yang digolongkan sebagai buah-buahan segar seperti nenas, anggur, apel, dan alpukat termasuk sebagai sarana sample dalam penelitian ini. Agar kadar asam urat di dalam makanan dan minuman dapat didata maka sample bahan baku makanan seperti telur, keju, tempe, dan tahu ikut dijadikan sebagai sample dalam penelitian ini. Secara terperinci data nama-nama makanan berwujud padat yang diduga mengandung asam urat di dalam sample dirangkum pada Tabel 5.13. Data pada Tabel 5.13 juga sebagai informasi terhadap randemen sample meliputi berat sample dalam keadaan basah dan berat sample setelah dilakukan pengeringan di dalam oven seperti dijelaskan dalam prosedur perlakuan sample.

Tabel 5.13. Deskripsi sampel berbagai jenis makanan yang diduga mengandung asam urat dari sampel bahan padat saat basah dan setelah dikeringkan

No	Nama sampel makanan	Berat Basah sampel (g)	Berat Kering sampel (g)	Randemen sampel (%)
1	Kulit sapi	10,08	2,93	29,09
2	Daging sapi	44,34	11,29	25,45
3	Usus sapi	45,50	7,46	16,40
4	Hati sapi	36,29	10,97	30,24
5	Kulit kambing	17,46	6,23	35,68
6	Daging kambing	41,33	8,73	21,13
7	Usus kambing	38,43	3,67	9,54
8	Hati kambing	25,75	5,98	23,21
9	Kulit kelinci	16,14	2,79	17,30
10	Daging kelinci	40,86	12,37	30,28
11	Usus kelinci	47,23	8,61	18,24
12	Hati kelinci	48,20	12,77	26,49
13	Kulit ayam	44,52	19,78	44,42
14	Daging ayam	49,79	12,05	24,19
15	Usus ayam	27,86	4,19	15,03
16	Hati ayam	23,16	5,73	24,75
17	Kerang	49,38	10,16	20,57
18	Cumi-cumi	49,96	7,38	14,77
19	Udang lobster	48,21	10,48	21,75
20	Udang	48,88	11,42	23,36
21	Kepiting	48,77	7,90	16,19
22	Tongkol	42,17	11,20	26,55
23	Dencis	42,10	10,07	23,93
24	Selar	39,17	8,40	21,44
25	Gembung	44,50	10,21	22,94
26	Mujair	45,33	10,51	23,18
27	Ikan mas	36,95	12,92	34,96
28	Lele	32,62	7,77	23,82
29	Gabus	46,45	8,48	18,26
30	Belut	30,15	5,60	18,58
31	Nila	49,62	11,17	22,51
32	Teri	27,29	17,35	63,56
33	Ikan asin	19,12	11,41	59,66
34	Pari -	20,93	15,09	72,11
35	Kacang merah	25,39	23,34	91,95
36	Kacang hijau	27,76	24,97	89,95
37	Kacang putih	26,87	24,84	92,47
38	Kacang kedelai	36,09	33,49	92,79
39	Kacang tanah	30,00	28,31	94,35
40	Nenas	39,43	6,80	17,24
41	Anggur	40,07	8,10	20,20
42	Apel	47,18	6,68	14,16
43	Alpukat	42,90	7,11	16,58
44	Telur	44,18	10,71	24,23
45	Keju	30,93	17,16	55,49
46	Tempe	34,96	12,81	36,63
47	Tahu	46,78	7,05	15,06

Berbagai jenis bahan makanan yang berwujud cair dalam keadaan mentah (raw materil) yang diduga mengandung asam urat juga dijadikan sebagai sampel. Sampel ini dikelompokkan sebagai jenis jus seperti jus alpukat, jus kueni, jus terung belanda, jus orange (kemasan), dan jus apel (kemasan). Sampel lain yang berbetuk cairan adalah berbagai jenis seperti susu susu bubuk putih, susu bubuk coklat, susu cair putih, susu cair coklat, susu kedelai, dan sari kacang hijau. Diskripsi sampel berbagai jenis minuman yang diduga mengandung asam urat dari sampel bahan cair dirangkum pada Tabel 5.14. Data pada Tabel 5.14 juga sebagai informasi terhadap randemen sample meliputi berat sample dalam keadaan basah (sebanyak 100 mL) dan berat sample setelah dilakukan pengeringan di dalam oven pada suhu 60 °C selama 6 hari sebagaimana dijelaskan dalam prosedur perlakuan sample.

Tabel 5.14. Deskripsi sampel berbagai jenis minuman yang diduga mengandung asam urat dari sampel bahan cair dan yang dikonsumsi cair saat berbentuk bahan baku dan setelah dikeringkan

No	Nama sampel	Wujud	Berat basah sampel (g)	Berat kering sampel (g)	Randemen sampel (%)	Warna*
1.	Jus alpukat	cair	103,55	25,27	24,40	Keruh
2.	Jus kueni	cair	98,77	28,93	29,29	Keruh
3.	Jus terung belanda	cair	105,18	20,56	19,55	Keruh
4.	Jus orange (kemasan)	cair	104,75	8,67	8,27	Keruh
5.	Jus apel (kemasan)	cair	104,63	14,13	13,50	Keruh
6.	Susu bubuk putih	padat	10,13	10,00	98,71	Keruh
7.	Susu bubuk coklat	padat	13,80	13,75	99,59	Keruh
8.	Susu cair putih	cair	101,93	9,83	9,64	Keruh
9.	Susu cair coklat	cair	105,01	19,25	18,34	Keruh
10.	Susu kedelai	cair	103,68	12,94	12,48	Keruh
11.	Sari kacang hijau	cair	104,88	16,85	16,07	Keruh

*Setelah dilarutkan dalam Li_2CO_3 0.4%

5.3.4.1. Perlakuan Sampel Untuk Analisis Asam Urat

Sampel bahan makanan dan minuman yang sudah dikeringkan dan disimpan sebagai stok sampel selanjutnya dianalisis untuk penentuan asam urat di dalam sampel menggunakan strip biosensor dan analisis menggunakan metode estándar spektrofotometri. Selanjutnya sampel dihomogenkan dengan cara menggerus sampai halus, kemudian sebanyak ± 1 mg sampel halus tersebut ditimbang kemudian dilarutkan dalam 1 mL LiCO_3 0,4% kemudian dipanaskan selam 30 menit untuk memastikan bahwa asam urat yang terdapat dalam sampel telah melarut dalam pelarut, selanjutnya larutan disimpan didalam botol sampel dan digunakan sebagai larutan stok untuk analisis asam urat dengan menggunakan strip biosensor dan spektrofotometri. Sebelum menganalisa sampel selalu dipanaskan terlebih dahulu untuk meyakinkan bahwa asam urat melarut sempurna di dalam larutannya.

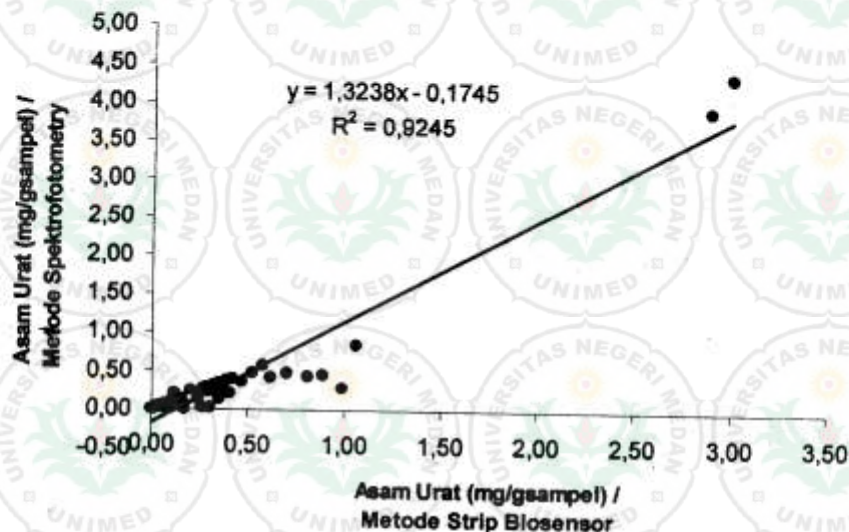
Tabel 5.15. Analisis asam urat dalam berbagai jenis makanan berwujud padatan dengan menggunakan strip biosensor dan metode standar spektrofotometri

No	Nama sampel makanan	Strip Biosensor			Spektrofotometri			Recovery Biosensor (%)
		I (mA)	As Urat (mg/L)	As Urat (mg/g sampel)	Abs (au)	As Urat (mg/L)	As Urat (mg/g sampel)	
1	Kulit sapi	0,075	1,116	0,325	0,121	1,105	0,321	101
2	Daging sapi	0,147	2,760	0,703	0,133	1,867	0,475	148
3	Usus sapi	0,105	1,801	0,295	0,125	1,359	0,223	133
4	Hati sapi	0,077	1,162	0,351	0,111	0,470	0,142	247
5	Kulit kambing	0,051	0,568	0,203	0,115	0,724	0,258	79
6	Daging kambing	0,134	2,463	0,520	0,139	2,248	0,475	110
7	Usus kambing	0,155	2,943	0,281	0,150	2,947	0,281	100
8	Hati kambing	0,097	1,619	0,376	0,119	0,978	0,227	166
9	Kulit kelinci	0,061	0,797	0,138	0,116	0,787	0,136	101
10	Daging kelinci	0,087	1,390	0,421	0,125	1,359	0,412	102
11	Usus kelinci	0,057	0,705	0,129	0,112	0,533	0,097	133
12	Hati kelinci	0,16	3,057	0,810	0,130	1,677	0,444	182
13	Kulit ayam	0,052	0,591	0,263	0,113	0,597	0,265	99
14	Daging ayam	0,085	1,345	0,325	0,125	1,359	0,329	99
15	Usus ayam	0,045	0,432	0,065	0,109	0,343	0,052	125
16	Hati ayam	0,033	0,158	0,039	0,105	0,089	0,022	177
17	Kerang	0,052	0,591	0,122	0,106	0,152	0,031	392
18	Cumi-cumi	0,077	1,162	0,172	0,104	0,025	0,004	4292
19	Udang lobster	0,036	0,226	0,049	0,106	0,152	0,033	149
20	Udang	0,083	1,299	0,303	0,105	0,089	0,021	1445
21	Kepiting	0,054	0,637	0,103	0,110	0,406	0,066	156
22	Tongkol	0,127	2,304	0,612	0,129	1,613	0,428	143
23	Dencis	0,111	1,938	0,464	0,128	1,549	0,371	125
24	Selar	0,097	1,619	0,347	0,129	1,613	0,346	100
25	Gembung	0,072	1,048	0,240	0,113	0,597	0,137	175
26	Mujair	0,053	0,614	0,142	0,106	0,152	0,035	407
27	Ikan mas	0,069	0,979	0,342	0,112	0,533	0,186	184
28	Lele	0,0454	0,441	0,105	0,110	0,406	0,097	108
29	Gabus	0,119	2,121	0,387	0,137	2,121	0,387	100
30	Belut	0,064	0,865	0,161	0,110	0,406	0,075	214
31	Nila	0,038	0,272	0,061	0,104	0,025	0,006	382
32	Teri	0,037	0,249	0,158	0,107	0,216	0,137	115
33	Ikan asin	0,091	1,482	0,884	0,116	0,787	0,470	188
34	Pari	0,086	1,368	0,986	0,110	0,406	0,293	337
35	Kacang merah	0,169	3,263	3,000	0,178	4,725	4,344	69
36	Kacang hijau	0,167	3,217	2,894	0,172	4,344	3,907	74
37	Kacang putih	0,041	0,340	0,315	0,109	0,343	0,317	99
38	Kacang kedelai	0,076	1,139	1,057	0,118	0,914	0,849	125
39	Kacang tanah	0,045	0,432	0,407	0,107	0,216	0,204	200
40	Nenas	0,027	0,021	0,004	0,104	0,025	0,004	89
41	Anggur	0,052	0,591	0,119	0,120	1,041	0,210	57
42	Apel	0,038	0,272	0,038	0,108	0,279	0,040	96
43	Alpukat	0,03	0,089	0,015	0,105	0,089	0,015	98
44	Telur	0,13	2,372	0,575	0,141	2,375	0,576	100
45	Keju	0,047	0,477	0,265	0,104	0,025	0,014	1891
46	Tempe	0,04	0,317	0,116	0,108	0,279	0,102	114
47	Tahu	0,03	0,089	0,013	0,104	0,025	0,004	335

5.3.4.2. Analisis Asam Urat Dalam Makanan Berwujud Padat

Strip biosensor dipergunakan untuk menentukan kadar asam urat yang terkandung di dalam bahan makanan yang berwujud padat. Hasil analisis asam urat di dalam sampel makan berwujud padat dengan menggunakan strip biosensor dilakukan dengan mengukur arus yang terbentuk di dalam strip biosensor pada saat menambahkan larutan sampel yang sudah dilarutkan di dalam litium karbonat 0,4%. Untuk meyakinkan apakah hasil analisis yang diperoleh dengan menggunakan strip biosensor dapat dipercaya maka telah dilakukan analisis perbandingan dengan menggunakan metode standar spektrofotometri UV-Vis secara reaksi enzimasi. Hasil analisis kadar asam urat di dalam makanan dan minuman cair dengan menggunakan strip biosensor dan standar spektrofotometri UV-Vis dirangkum pada Tabel 5.15.

Untuk meyakinkan apakah hasil analisis yang diperoleh dengan menggunakan biosensor dapat dipercaya maka telah dilakukan analisis perbandingan dengan menggunakan standar spektrofotometri UV-VIS. Plot antara hasil analisis terhadap kadar asam urat di dalam sampel makanan dan minuman cair yang dianalisis dengan menggunakan biosensor dan standar spektrofotometri UV-VIS diperlihatkan pada Gambar 5.27.



Gambar 5.27 Analisis asam urat di dalam berbagai jenis sampel padat menggunakan metode strip biosensor dan metode standar spektrofotometry.

Hasil analisis asam urat menggunakan strip biosensor dan spektrofotometry secara reaksi enzimasi yang diperoleh pada Tabel 5.15 menunjukkan bahwa temuan hasil analisis menggunakan biosensor hampir semuanya memiliki recovery diatas 100%, bahkan ada yang melebihi. Perbedaan beberapa hasil analisis menggunakan dua metode analisis ini

disebabkan oleh adanya sampel yang memiliki senyawa pengganggu (zat warna) yang terkandung di dalam beberapa sampel yang mengakibatkan absorbansi pada metode spektrofotometri tercatat tinggi, sementara pada strip biosensor diperoleh pengukuran arus (A) pada masing-masing sampel tidak dipengaruhi oleh zat warna yang terkandung di dalam sampel, hanya ditentukan kehadiran senyawa (kadar) asam urat di dalam sampel. Untuk beberapa sampel yang memiliki warna maka pengukuran secara spektrofotometri tidak dapat dipertanggungjawabkan.

Hasil analisis asam urat yang terkandung di dalam makanan seperti diperlihatkan pada Gambar 5.27 menunjukkan bahwa penentuan kadar asam urat secara strip biosensor dan metode standar memiliki hasil yang relatif hampir sama (bandingkan hasil pada Tabel 5.15), yaitu koefisien korelasi antara hasil analisis menggunakan dua metode analisis berada pada $R^2=0,924$, yang memberikan arti bahwa hasil analisis strip biosensor dapat dipercaya bila dibandingkan dengan hasil analisis menggunakan metode analisis standar untuk asam urat menggunakan standar spektrofotometri UV-VIS.

5.3.4.3. Analisis Asam Urat Dalam Makanan Berwujud Padat

Dengan cara yang sama seperti analisis sampel berwujud padat maka dilakukan analisis asam urat dalam berbagai jenis sampel berwujud cairan. Metode analisis strip biosensor dilakukan untuk menentukan asam urat yang terkandung di dalam berbagai jenis minuman yang diduga mengandung asam urat dengan cara mengukur arus yang terbentuk di dalam strip biosensor pada saat menambahkan larutan sampel yang sudah dilarutkan di dalam litium karbonat 0,4%. Sebagai bahan pembanding maka dilakukan analisis menggunakan metode standar spektrofotometri UV-Vis melalui reaksi enzimasi. Hasil analisis kadar asam urat di dalam makanan dan minuman cair dengan menggunakan strip biosensor dan standar spektrofotometri UV-Vis dirangkum pada Tabel 5.16.

Untuk melihat hasil penentuan kadar asam urat di dalam berbagai jenis minuman diketahui temuan bahwa hampir semua hasil analisis menggunakan biosensor lebih tinggi dibanding hasil analisis secara spektrofotometri, dengan temuan (recovery) di atas 100% (lihat data pada Tabel 5.16). Di samping itu, ada beberapa sampel yang dianalisis secara spektrofotometri tidak memberikan hasil (tidak terdeteksi, ND), sedangkan dengan metode analisis strip biosensor semua sampel dapat dianalisis kadar asam urat yang terkandung di dalam minuman, disebabkan oleh kelemahan di dalam metode spektrofotometri yang sangat dipengaruhi oleh warna sampel yang dianalisis, sedangkan penentuan dengan menggunakan biosensor elektrokimia kehadiran zat warna sampel tidak mengganggu di

dalam analisis. Hasil analisis menunjukkan bahwa semua sampel berwujud cair yang dianalisis mengandung asam urat dengan kadar rendah antara 0,03 µg/L sampai 5,22 µg/L sample. Hasil ini menunjukkan bahwa kadar asam urat yang terdapat di dalam sample minuman yang dianalisis menggunakan strip biosensor hamper sama dengan kadar asam urat yang diperoleh dengan menggunakan metode standar spektrofotometri UV/Vis,

Tabel 5.16. Analisis asam urat dalam berbagai jenis makanan berwujud cairan dengan menggunakan strip biosensor dan metode standar spektrofotometri

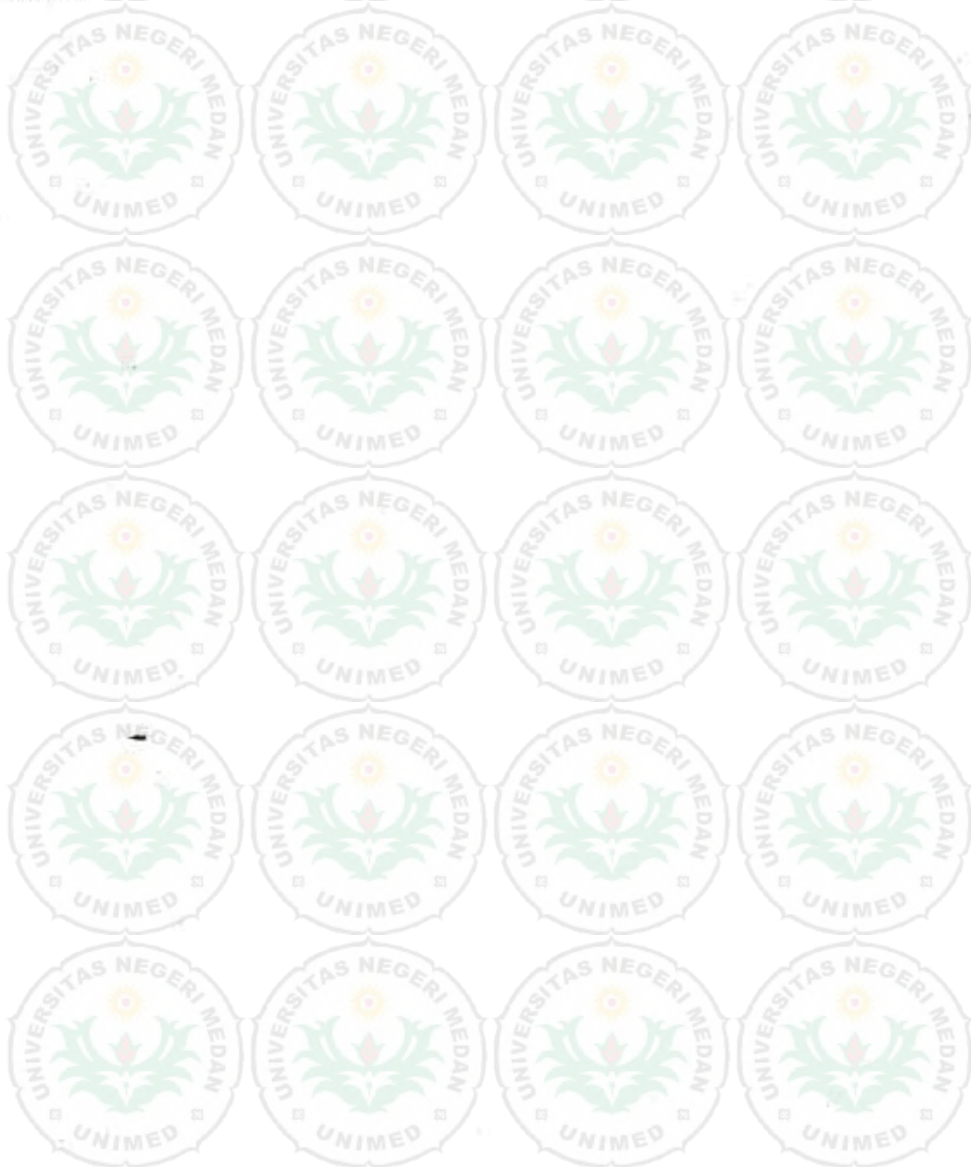
No	Nama Sampel Minuman	Strip Biosensor			Spektrofotometri			Recovery Biosensor (%)
		<i>I</i> (mA)	As Urat (mg/L)	As Urat (mg/L sampel)	Abs (au)	As Urat (mg/L)	As Urat (mg/L sampel)	
1	Jus alpukat	0,02620	0,00239	0,00241	0,11900	0,00978	0,00239	101
2	Jus kueni	0,02622	0,00268	0,00396	0,11800	0,00914	0,00268	148
3	Jus terung belanda	0,02617	0,00154	0,00205	0,11600	0,00787	0,00154	133
4	Jus orange	0,02613	0,00060	0,00148	0,11500	0,00724	0,00060	247
5	Jus apel (kemasan)	0,02910	0,06853	0,05414	0,10400	0,00025	0,00003	79
6	Susu putih	0,02699	0,02031	0,02234	0,13600	0,02058	0,02031	110
7	Susu coklat	0,02628	0,00405	0,00405	0,11000	0,00406	0,00405	100
8	Susu cair putih	0,02618	0,00186	0,00309	0,13400	0,01931	0,00186	166
9	Susu cair coklat	0,02633	0,00517	0,00522	0,14800	0,02820	0,00517	101
10	Susu kedelai	0,02621	0,00241	0,00246	0,13400	0,01931	0,00241	102
11	Sari kacang hijau	0,02614	0,00086	0,00114	0,11200	0,00533	0,00086	133



Gambar 5.28 Analisis asam urat di dalam berbagai jenis sampel berwujud cairan setelah perlakuan sampel dengan menggunakan metode strip biosensor dan metode standar spektrofotometri.

Untuk meyakinkan hasil analisis asam urat di dalam sampel cairan dengan menggunakan strip biosensor maka hasil analisis strip biosensor dikorelasikan dengan hasil

analisis menggunakan metode standar seperti terangkum dalam Tabel 5.16, dan diperoleh korelasi analisis menggunakan dua jenis metoda ($R^2=0,992$), seperti diperlihatkan pada Gambar 5.28. Dari hasil ini dinyatakan bahwa hasil analisis strip biosensor dapat dipercaya bila dibandingkan dengan hasil analisis menggunakan metode analisis standar untuk asam urat menggunakan standar spektrofotometri UV-VIS. Karena strip biosensor sudah dapat dipergunakan untuk analisis asam urat di dalam sampel maka metode analisis ini sudah layak untuk dikembangkan lebih lanjut untuk mendapatkan sensitifitas yang lebih baik dan daya analisis yang lebih mudah dan sederhana, yaitu yang diperlukan di dalam penelitian lanjutan.



BAB VI

KESIMPULAN DAN SARAN

6.1. Kesimpulan

Biosensor elektrokimia untuk penentuan kadar asam urat untuk kontrol kualitas makanan dan minuman yang dikembangkan dalam penelitian ini memberikan hasil yang mengembirakan. Biosensor elektrokimia terdiri atas 3 bagian, yaitu (1) Biosensor elektrokimia dalam sistem Flow injeksi analisis menggunakan deteksi potensiometri untuk penentuan kolesterol dan asam urat, (2) Biosensor elektrokimia dalam sistem statik menggunakan deteksi amperometri untuk penentuan asam urat, dan (3) Strip biosensor untuk penentuan asam urat. Pada Masing-masing hasil yang diperoleh dalam periode penelitian disimpulkan sebagai berikut>

(1) Biosensor elektrokimia dalam sistem FIA penentuan kolesterol dan asam urat telah berhasil dibuat, dan disimpulkan bahwa:

- a. rancang bangun biosenor elektrokimia dalam sistem flow injeksi analisis (FIA) yang yang dikembangkan melalui integrasi enzim memberikan tahapan hasil yang mengembirakan, yaitu memberikan respon terhadap analit dengan kondisi percobaan yang optimum adalah menggunakan redoks mediator 5 mM $K_4Fe(CN)_6$, carrier stream 10 mM buffer posfat pH 6.0, laju aliran carrier stream 1.5 mL/menit, volume injeksi dampil 50 μ L.
- b. Biosensor dengan deteksi potensiometri elektrokimia dalam sistem FIA dapat digunakan untuk penentuan kolesterol di dalam sampel makanan dan minuman. Metode analisis sangat sensitif terhadap kolesterol, linearitas pengukuran lebar (0,005 – 5,0 mM kolesterol), slope 58,29 mV/perdekade konsentrasi kolesterol, dan batas deteksi 0,001 mM kolesterol. Biosensor telah diaplikasikan untuk penentuan kolesterol di dalam sampel seperti pada sampel daging segar (0,25-0,35 mM/g sampel), daging kaleng (0,50-0,60 mM/g sampel), dan minuman kaleng berlemak (0,58-0,80 mM).
- c. Biosensor dengan deteksi potensiometri elektrokimia dalam sistem FIA dapat digunakan untuk penentuan asam urat di dalam sampel makanan dan minuman. Metode analisis sangat sensitif terhadap asam urat, linearitas pengukuran berada pada skala konsentrasi 0,05 – 5,0 mM asam urat, slope 63,59 mV/perdekade konsentrasi asam urat, dan batas deteksi 0,05 mM kolesterol.

d. Metode analisa biosensor dalam sistem FIA memiliki kelebihan dalam hal selektifitas, sensitifitas, linieritas pengukuran, dan kecepatan analisis dan kesederhanaan prosedur analisis. Metode FIA sangat sederhana, menggunakan komponen instrumen yang relatif murah, dan sangat baik digunakan untuk menganalisis kualitas makanan dan minuman..

(2) **Biosensor elektrokimia dalam sistem statik menggunakan deteksi amperometri untuk penentuan asam urat, dan disimpulkan bahwa:**

- a. Pengembangan biosensor untuk penentuan kadar sama urat telah dilakukan dengan cara immobilisasi enzim urat oksidase atau urikase (UOx) pada matriks polityramin menggunakan *crosslinking agent* EDC/NHS untuk mendapatkan enzim elektroda yang memiliki aktivitas baik terhadap asam urat.
- b. Biosensor asam urat memberikan respon yang baik terhadap asam urat, yaitu arus yang terbentuk dalam sistem elektrokimia berasal dari hidrogen peroksida yang dihasilkan dari reaksi enzimasi meningkat setara dengan meningkatnya konsentrasi asam urat di dalam sampel, skala linearitas 0,1 – 2,5 mM, sensitivitas baik (slop 0,06 $\mu\text{A}/\text{mM}$ asam urat), keterulangan tinggi ($\text{CV}=0,02\text{-}0,09$), stabil untuk penggunaan berulang-ulang dalam jangka waktu lama, bebas dari pengaruh senyawa pengganggu, akurasi penganalisisan baik dengan temuan 100-102%.
- c. Biosensor asam urat telah diaplikasikan untuk analisis kualitas makan dan minuman dalam berbagai jenis sampel seperti sayuran, buah-buahan, berbagai jenis makanan kaleng, berbagai jenis bagian daging, dan berbagai jenis ikan. Penentuan kadar asam urat di dalam sampel menggunakan biosensor dan standar spektrofotometri UV-Vis ($R^2=0,9354$).

(3) **Strip biosensor untuk penentuan asam urat, dan disimpulkan bahwa**

- a. Strip biosensor untuk penentuan kadar asam urat telah dikembangkan dengan cara immobilisasi enzim urat oksidase atau urikase (UOx) pada matriks polityramin menghasilkan instrumen analisis yang memberikan respon yang baik terhadap asam urat dengan linearitas pengukuran berada pada skala konsentrasi 0,1 – 4 mM, slop 0,044 $\mu\text{A}/\text{mM}$ asam urat.
- b. Strip Biosensor asam urat telah diaplikasikan untuk analisis kualitas makan dan minuman dalam berbagai jenis sampel dan hasil analisis asam urat di dalam sampel

hampir sama dengan kadar asam urat menggunakan metode standar ($R^2=0,924$), dan temuan strip biosensor lebih baik dibanding metode standar spektrofotometri UV-VIS

6.2. Saran

Dari hasil penelitian ini telah diperoleh langkah dan strategi yang tepat dalam membuat rancang bangun biosensor elektrokimia sebagai instrumen analisis untuk kontrol kualitas makanan dan minuman. Biosensor yang berhasil dilakukan dalam studi ini dapat dipergunakan sebagai strategi untuk membuat rancang bangun biosensor elektrokimia sebagai instrumen analisis untuk kontrol kualitas makanan dan minuman yang direncanakan dilanjutkan dalam penelitian berikutnya. Untuk memperoleh hasil yang optimum diharapkan perlu dilakukan penelitian lanjutan untuk meningkatkan batas deteksi agar dapat mendeteksi senyawa asam urat pada konsentrasi lebih rendah, dan membuat miniatur rancang bangun biosensor elektrokimia sebagai instrumen analisis khususnya studi intensip untuk membuat biosensor strip agar dapat digunakan sebagai metode standar untuk kontrol kualitas makanan dan minuman dan dapat diproduksi secara massal yang memiliki nilai ekonomi.



DAFTAR PUSTAKA

- Akyilmaz, E.; Sezgin Turk, M.K. dan Dinckaya, E., (2003), A biosensor based on urate oxidase-peroxidase coupled enzyme system for uric acid determination in urine, *Talanta* **61**(2): 73 - 79
- Albert, K.J.; Lewis, N.S.; Schauer, C.L.; Sotzing, G.A.; Stitzel, S.E.; Vaid, T.P. and Walt, D.R., (2000), Cross-reactive chemical sensor arrays, *Chemical Reviews* **100**: 2595-2626.
- Alper, A.B. Jr., Chen, W., Yau, L., Srinivasan, S.R., Berenson, G.S., dan Hamm, L.L., (2005), Childhood uric acid predicts adult blood pressure: the Bogalusa Heart Study., *Hypertension*, **45**(1): 34-38.
- Bassi, A.S. dan McGrath, C. (1999), Carbon paste biosensor based on crude soybean seed hull extracts for phenol detection, *Journal of Agricultural & Food Chemistry* **47**: 322-326.
- Bruun, S.W., Søndergaard, I., dan Jacobsen S, (2007), Analysis of protein structures and interactions in complex food by near-infrared spectroscopy. 1. Gluten powder, *J Agric Food Chem* **55**(18): 7234-43
- Buldini, P.L.; Ricci, L. dan Sharma, J.L., (2002), Recent applications of sampel preparation techniques in food analysis, *Journal Of Chromatography A* **975**(1): 47-70.
- Campanella, L.; Cordatore, M.; Mazzei, F. dan Tomassetti, M., (1990), Determination of inorganic phosphate in drug formulations and biological fluids using a plant tissue electrode, *Journal of Pharmaceutical & Biomedical Analysis* **8**: 711-716.
- Capar, S.G., Mindak, W.R., dan Cheng, J., (2007), Analysis of food for toxic elements, *Anal Bioanal Chem* **389**(1): 159-169
- Castillo-Ortega, M.M.; Rodriguez, D.E.; Encinas, J.C.; Plascencia, M.; Méndez-Velarde, F.A. dan Olayo, R. (2002), Conductometric uric acid and urea biosensor prepared from electroconductive polyaniline-poly(*n*-butyl methacrylate) composites, *Sensors And Actuators B: Chemical* **85**(1-2): 19-25.
- Centronic, G, (2003), Enzymatic Colorimetric Assay For Determination of Uric Acid in Serum or Urine, www.Centronic-GmbH.com/pdf/holyo.pdf
- Cherubini, A.; Polidori, M.C.; Bregnocchi, M.; Pezzuto, S.; Cecchetti, R.; Ingegneri, T.; di Iorio, A.; Senin, U. dan Mecocci, P., (2000), Antioxidant profile and early outcome in stroke patients, *Stroke (Online)* **31**: 2295-2300.
- Cosnier, S., (1999), Biomolecule immobilization on electrode surfaces by entrapment or attachment to electrochemically polymerized films. A review, *Biosensors & Bioelectronics* **14**: 443-456.
- Cummings, E.A.; Mailley, P.; Linquettemailley, S.; Eggins, B.R.; Mcadams, E.T. dan Mcfadden, S., (1998), Amperometric carbon paste biosensor based on plant tissue for the determination of total flavanol content in beers, *Analyst* **123**: 1975-1980.
- Czauderna, M. dan Kowalczyk, J., (2000), Quantification of allantoin, uric acid, xanthine and hypoxanthine in ovine urine by high-performance liquid chromatography and photodiode array detection, *Journal of Chromatography. B, Biomedical Sciences & Applications* **744**: 129-138.
- D'Anna, R.; Baviera, G.; Scilipoti, A.; Leonardi, I. dan Leo, R., (2000), The clinical utility of serum uric acid measurements in pre-eclampsia and transient hypertension in pregnancy, *Panminerva Medica* **42**: 101-103.
- Emr, SA. and Yacynych, A.M. (1995), Use of polymer film in amperometric biosensors, *Electroanalysis* **7**: 913-923.

- Galbán, J.; Andreu, Y.; Almenara, M.J.; de Marcos, S. dan Castillo, J.R., (2001), Direct determination of uric acid in serum by a fluorometric-enzymatic method based on uricase, *Talanta* **54**(5): 847-854.
- Hall, E.A.H., (1991), *Biosensor*, Prentice Hall. Englewood Cliffs, New Jersey.
- Hasebe, Y.; Nawa, K.; Ujita, S. dan Uchiyama, S., (1998), Highly sensitive flow detection of uric acid based on an intermediate regeneration of uricase, *Analyt* **123**: 1775-1780.
- Hong, H.C. dan Huang, H.J., (2003), Flow injection analysis of uric acid with a uricase-and horseradish peroxidase-coupled Sepharose column based luminol chemiluminescence system, *Analytica Chimica Acta* **499**(1-2): 41-46.
- Horie, H. dan Rechnitz, G.A., (1995), Hybrid tissue enzyme biosensor for pectin, *Analytica Chimica Acta* **306**: 123-127.
- Inoue, K.; Namiki, T.; Iwasaki, Y.; Yoshimura, Y. dan Nakazawa, H., (2003), Determination of uric acid in human saliva by high-performance liquid chromatography with amperometric electrochemical detection, *Journal Of Chromatography B, Analytical Technologies In The Biomedical And Life Sciences* **785**(1): 57-63.
- Ishizaka, N., Ishizaka, Y., Toda, E., Hashimoto, H., Nagai, R., dan Yamakado, M., (2007), Higher serum uric acid is associated with increased arterial stiffness in Japanese individuals., *Atherosclerosis* **192**(1): 131-137
- Jen, J.F.; Hsiao, S.L. Dan Liu, K.H., (2002), Simultaneous determination of uric acid and creatinine in urine by an eco-friendly solvent-free high performance liquid chromatographic method, *Talanta* **58**(4): 711-717.
- Kahn, K. dan Tipton, P.A., (1998), Spectroscopic characterization of intermediates in the urate oxidase reaction, *Biochemistry* **37**: 11651-11659.
- Kang, D.H., dan Nakagawa, T., (2005), Uric acid and chronic renal disease: possible implication of hyperuricemia on progression of renal disease., *Semin Nephrol.* **25**(1): 43-49.
- Kang, D.H., Nakagawa, T., Feng, L., Watanabe, S., Han, L., Mazzali, M., Truong, L., Harris, R., dan Johnson, R.J., (2002), A role for uric acid in the progression of renal disease., *J Am Soc Nephrol.* **13**(12): 2888-2897.
- Karube, I. dan Nomura, Y., (2000), Enzyme sensors for environmental analysis, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **10**: 879-990.
- Konig, A.; Bachmann, T.T.; Metzger, J.W. dan Schmid, R.D., (1999), Disposable sensor for measuring the biochemical oxygen demand for nitrification and inhibition of nitrification in wastewater, *Applied Microbiology & Biotechnology* **51**: 112-117.
- Krisnatuti, Diah, (2001), *Perancangan Menu Untuk Penderita Gangguan Asam Urat*, cetakan kelima, Penebar Swadaya, Jakarta
- Liang, J.F.; Li, Y.T. dan Yang, V.C., (2000), Biomedical application of immobilized enzymes, *Journal of Pharmaceutical Sciences* **89**: 177-181.
- Liese, A.D.; Hense, H.W.; Lowel, H.; Doring, A.; Tietze, M. dan Keil, U., (1999), Association of serum uric acid with all-cause and cardiovascular disease mortality and incident myocardial infarction in the MONICA Augsburg cohort. World Health Organization Monitoring Trends and Determinants in Cardiovascular Diseases, *Epidemiology* **10**: 391-397.
- Lima, A.W.O.; Nascimento, V.B.; Pedrotti, J.J. dan Angnes, L., (1997), Coconut-based plant tissue reactor for biosensing of catechol in flow injection analysis, *Analytica Chimica Acta* **354** 325-331.
- Maesaka, J.K. dan Fishbane, S., (1998), Regulation of renal urate excretion: a critical review, *American Journal of Kidney Diseases* **32**: 917-933.

- Marklund, N.; Ostman, B.; Nalmo, L.; Persson, L. dan Hillered, L., (2000), Hypoxanthine, uric acid and allantoin as indicators of in vivo free radical reactions. Description of a HPLC method and human brain microdialysis data, *Acta Neurochirurgica* **142**:1135-1141.
- Miertuš, S.; Katrlík, J.; Pizzariello, A.; Stred'anský, M.; Švitel, J. dan Švorc, J., (1998), Amperometric biosensors based on solid binding matrices applied in food quality monitoring, *Biosensors And Bioelectronics* **13**(7-8): 911-923.
- Nagahama, K., Inoue, T., Iseki, K., Touma, T., Kinjo, K., Ohya, Y., dan Takishita, S., (2004), Hyperuricemia as a predictor of hypertension in a screened cohort in Okinawa, Japan., *Hypertens Res.* **27**(11): 835-841
- Niizeki, T., Takeishi, Y., Arimoto, T., Okuyama, H., Nozaki, N., Hirono, O., Tsunoda, Y., Watanabe, T., Nitobe, J., Miyashita, T., Takahashi, H., Koyama, Y., dan Kubota, I., (2006), Hyperuricemia associated with high cardiac event rates in the elderly with chronic heart failure., *J Cardiol.* **47**(5): 219-228
- Oungpipat, W.; Alexander, P.W. dan Southwellkeely, P., (1995), A reagentless amperometric biosensors for hydrogen peroxide determination based on asparagus tissue and ferrocene mediation, *Analytica Chimica Acta* **309**: 35-45.
- Peris, M., (2002), Present and future of expert systems in food analysis, *Analytica Chimica Acta* **454**(1): 1-11.
- Perlstein, T.S., Gumieniak, O., Hopkins, P.N., Murphey, L.J., Brown, N.J., Williams, G.H., Hollenberg, N.K., dan Fisher, N.D., (2004), Uric acid and the state of the intrarenal renin-angiotensin system in humans., *Kidney Int.* **66**(4): 1465-1470.
- Perlstein, T.S., Gumieniak, O., Williams, G.H., Sparrow, D., Vokonas, P.S., Gaziano, M., Weiss, S.T., dan Litonjua, A.A., (2006), Uric acid and the development of hypertension: the normative aging study., *Hypertension* **48**(6): 1031-1036
- Prakash, S. dan Chang, T.M., (2000), In vitro and in vivo uric acid lowering by artificial cells containing microencapsulated genetically engineered *E. coli* DH5 cells, *International Journal of Artificial Organs* **23**: 429-435.
- Pravdova, V.; Boucon, C.; de Jong, S.; Walczak, B. dan Massart, D.L., (2002), Three-way principal component analysis applied to food analysis: an example, *Analytica Chimica Acta* **462**(2): 133-148.
- Qin, W.; Zhang, Z.J.; Peng, Y.Y. dan Li, B.X., (1999), Plant tissue based cheluminescence flow biosensor for oxalate, *Analytical Communication* **36**: 337-339.
- Situmorang, M. dan Gooding, J.J., (2000), New biosensors for wine analysis, *ChemoSense* **2**(4): 1-3.
- Situmorang, M.; Gooding, J.J. dan Hibbert, D.B., (1999), Immobilisation of enzyme throughout a polityramine matrix: a versatile procedure for fabricating biosensors, *Analytica Chimica Acta* **394**: 211-223.
- Situmorang, M.; Gooding, J.J.; Hibbert, D.B. and Barnett, D., (1998), Electrodeposited polityramin as an immobilisation matrix for enzyme biosensors, *Biosensors & Bioelectronics* **13**(9): 953-962.
- Situmorang, M.; Gooding, J.J.; Hibbert, D.B. dan Barnett, D., (2001), Development of potentiometric biosensors using electrodeposited polityramine as the enzyme immobilisation matrix, *Electroanalysis* **13**: 1469-1474.
- Situmorang, M.; Hibbert, D.B.; Gooding, J.J. dan Barnett, D., (1999), A sulfite biosensor fabricated using electrodeposited polityramine: application to wine analysis, *Analyst* **124**: 1775-1779.
- Skoog, D. A. and Leary, J. J., (1992), *Principles of Instrumental Analysis*, 4th ed., Saunders College Publishers, New York.

- Steven, S.J. dan Lehotay, J., (2002), Application of gas chromatography in food analysis, *Trends in Analytical Chemistry* **21(9-10)**: 686-697.
- Takemoto, D.; Furuse, K.; Doke, N. dan Kawakita, K., (1997), Identification of chitinase and osmotin-like protein as actin-binding proteins in suspension-cultured potato cells, *Plant & Cell Physiology* **38**: 441-448.
- Utami, P., (2003), *Tanaman Obat untuk Mengatasi Rematik dan Asam Urat*, Agromedia, Jakarta
- Uzun, K.; Vural, H.; Ozer, F. dan Imecik, O., (2000), Diagnostic value of uric acid to differentiate transudates and exudates, *Clinical Chemistry & Laboratory Medicine* **38**: 661-665.
- Vo-Dinh, T. dan Cullum, B., (2000), Biosensors and biochips: advances in biological and medical diagnostics, *Fresenius Journal of Analytical Chemistry* **366**: 540-551.
- Wijesuriya, D.C. dan Rechnitz, G.A., (1993), Biosensors based on plant and animal tissues, *Biosensors & Bioelectronics* **8**: 155-160.
- Yamamoto, Y., Matsubara, K., Igawa, G., Kaetsu, Y., Sugihara, S., Matsuura, T., Ando, F., Sonoyama, K., Hamada, T., Ogino, K., Igawa, O., Shigemasa, C., dan Hisatome, I., (2007), Status of uric acid management in hypertensive subjects, *Hypertens Res.* **30(6)**: 549-554
- Yao, T dan Takashima, K., (1998), Amperometric biosensor with a composite membrane sol-gel derived enzyme film and electrochemical generated poly(1,2-diaminobenzene) film, *Biosensors & Bioelectronics* **13**: 67-73.
- Zhang, Y.Q.; Shen, W.D.; Gu, R.A.; Zhu, J. dan Xue, R.Y., (1998), Amperometric biosensor for uric acid based on uricase-immobilized silk fibroin membrane, *Analytica Chimica Acta* **369(1-2)**: 123-128.



Lampiran 1. Analisis asam urat di dalam sampel makanan dan minuman menggunakan metode analisis biosensor elektrokimia dan Spektrofotometri UV-Vis (Data lengkap masing-masing metode analisis diperlihatkan pada Lampiran 2 dan lampiran 3)

No	Nama Sampel	Berat sampel (g)	Analisis Kadar Asam Urat di dalam sampel dengan Metode					
			Biosensor Elektrokimia*			Spektrofotometri UV-Vis**		
			mM	mg	mg/kg sampel	mM	mg	mg/kg sampel
Sayuran								
1	Bayam hijau	0,0014	0,058	9,69	6,92	0,055	9,23	6,59
2	Kangkung	0,0014	0,025	4,27	3,05	ND	ND	ND
3	Brokoli	0,0015	0,942	158,39	105,60	0,933	156,83	104,56
4	Daun singkong	0,0013	0,019	3,20	2,47	0,018	3,08	2,37
5	Melingo	0,0014	0,003	0,58	0,41	ND	ND	ND
6	Bayam merah	0,0017	0,038	6,36	3,74	ND	ND	ND
7	Bunga kol	0,0019	0,495	83,16	43,77	0,494	83,03	43,70
8	Apel	0,0015	1,925	323,66	215,77	1,921	322,89	215,26
9	Durian	0,0019	0,897	150,84	79,39	0,896	150,68	79,31
10	Alpukat	0,0015	1,524	256,13	170,75	1,518	255,24	170,16
Kacang-kacangan								
11	Kacang tanah	0,0018	1,569	263,69	146,49	1,555	261,39	145,22
12	Kacang kedelai hitam	0,0012	0,790	132,83	110,70	ND	ND	ND
13	Kacang kedelai	0,0015	0,965	162,21	108,14	0,970	162,98	108,66
14	Kacang hijau	0,0013	0,058	9,69	7,45	0,055	9,23	7,10
15	Kacang merah	0,0011	0,064	10,76	9,78	0,055	9,23	8,39
16	Kacang merah es	0,0019	0,652	109,56	57,67	ND	ND	ND
17	Tempe	0,0013	1,715	288,25	221,73	1,701	285,99	219,99
18	Tahu	0,0018	1,244	209,06	116,14	1,226	206,04	114,47
Makanan Kaleng								
19	Daging sapi kaleng A1	0,0017	2,515	422,77	248,69	2,470	415,15	244,21
20	Daging sapi kaleng A2	0,0018	1,718	288,80	160,45	1,701	285,99	158,88
21	Ikan makarel B1	0,0015	0,123	20,75	13,84	0,128	21,53	14,35
22	Ikan makarel B2	0,0017	0,137	23,04	13,55	0,128	21,53	12,66
23	Ikan makarel B3	0,0017	3,027	508,91	299,36	2,982	501,25	294,86
24	Ikan makarel B4	0,0013	0,134	22,55	17,35	0,128	21,53	16,56
25	Ikan makarel B5	0,0018	0,043	7,29	4,05	0,384	64,58	35,88
26	Ikan sarden C1	0,0015	0,088	14,73	9,82	ND	ND	ND
27	Ikan sarden C2	0,0018	1,052	176,78	98,21	1,006	169,14	93,96
28	Ikan sarden C3	0,0016	0,299	50,20	31,38	ND	ND	ND
29	Ikan sarden C4	0,0014	2,479	416,66	297,62	2,433	409,00	292,14
30	Ikan sarden C5	0,0017	2,488	418,19	245,99	2,470	415,15	244,21
Daging Segar								
31	Daging sapi	0,0019	3,173	533,48	280,78	3,128	525,86	276,77
32	Jantung Sapi	0,0019	2,487	418,11	220,06	2,396	402,85	212,03
33	Hati sapi	0,0019	0,903	151,74	79,86	0,823	138,38	72,83
34	Usus sapi	0,0014	0,356	59,82	42,73	0,348	58,43	41,73
35	Daging kambing	0,0019	3,575	601,08	316,36	3,494	587,36	309,14
36	Jantung kambing	0,0013	1,216	204,48	157,29	1,189	199,89	153,76

37	Ginjal kambing	0,0012	1,527	256,74	213,95	1,482	249,09	207,57
38	Limfa Kambing	0,0019	3,329	559,65	294,55	3,311	556,61	292,95
39	Usus Kambing	0,0014	0,148	24,84	17,74	0,128	21,53	15,38
40	Hati Kambing	0,0012	0,397	66,68	55,57	0,348	58,43	48,69
41	Daging ayam	0,0015	1,161	195,25	130,16	1,116	187,59	125,06
42	Jantung ayam	0,0015	1,122	188,61	125,74	ND	ND	ND
43	Rempelo ayam	0,0018	2,579	433,53	240,85	2,543	427,45	237,47
44	Hati ayam	0,0019	0,210	35,33	18,59	0,165	27,68	14,57
45	Usus ayam	0,0012	0,446	74,92	62,44	0,384	64,58	53,82
46	Daging Kelinci	0,0016	0,865	145,37	90,86	0,823	138,38	86,49
47	Jantung kelinci	0,0014	2,263	380,35	271,68	2,213	372,10	265,78
48	Ginjal kelinci	0,0015	0,819	137,72	91,81	ND	ND	ND
49	Usus kelinci	0,0015	0,708	119,10	79,40	0,677	113,78	75,85
50	Hati kelinci	0,0016	1,057	177,77	111,11	0,604	101,48	63,43
51	Limfa kelinci	0,0017	2,148	361,04	212,38	1,921	322,89	189,94
	Ikan Segar							
52	Udang	0,0012	0,132	22,12	18,44	0,128	21,53	17,94
53	Udang lobster	0,0018	2,487	418,11	232,29	2,396	402,85	223,80
54	Kerang	0,0018	3,153	530,12	294,51	2,762	464,35	257,97
55	Cumi-cumi	0,0019	2,121	356,62	187,69	2,030	341,35	179,66
56	Kepiting	0,0019	0,698	117,38	61,78	0,640	107,63	56,65
57	Belut	0,0013	0,635	106,68	82,06	0,457	76,88	59,14
58	Dencis	0,0017	0,547	92,03	54,14	0,494	83,03	48,84
59	Mujahir	0,0012	1,780	299,20	249,33	1,555	261,39	217,83
60	Selar	0,0015	1,775	298,40	198,93	1,774	298,29	198,86
61	Tongkol	0,0018	1,161	195,25	108,47	1,116	187,59	104,21
62	Bandeng	0,0016	1,573	264,37	165,23	1,482	249,09	155,68
63	Teri	0,0014	1,079	181,36	129,54	1,043	175,29	125,20
64	Ikan mas	0,0017	0,171	28,76	16,92	ND	ND	ND

Penentuan dilakukan pada potensial konstan $E=0,60$ V vs Ag/AgCl di dalam larutan buffer fosfat
 * Penentuan dilakukan menggunakan *o*-dianisidin pada $\lambda 520$ nm



Lampiran 2. Analisis asam urat di dalam makanan dan minuman secara biosensor elektrokimia: 1 mg sampel dilarutkan dalam larutan 1 ml Li_2CO_3 (4%), 50 μl sampel disuntikkan ke dalam buffer fosfat, dan analisis dilakukan pada E konstan 0,60 V

No.	Nama Sampel	Berat sampel (g)	Pengukuran kadar asam urat dalam sampel*				
			I (mA) vs Ag/AgCl	Standar (mM)	mM	mg	mg/kg sampel
Sayuran							
1	Bayam hijau	0,0014	0,024	0,192	0,058	9,69	6,92
2	Kangkung	0,0014	0,017	0,085	0,025	4,27	3,05
3	Brokoli	0,0015	0,219	3,141	0,942	158,39	105,60
4	Daun singkong	0,0013	0,016	0,064	0,019	3,20	2,47
5	Melindo	0,0014	0,012	0,011	0,003	0,58	0,41
6	Bayam merah	0,0017	0,020	0,126	0,038	6,36	3,74
7	Bunga kol	0,0019	0,120	1,649	0,495	83,16	43,77
8	Apel	0,0015	0,436	6,418	1,925	323,66	215,77
9	Durian	0,0019	0,209	2,991	0,897	150,84	79,39
10	Alpukat	0,0015	0,347	5,079	1,524	256,13	170,75
Kacang-kacangan							
11	Kacang tanah	0,0018	0,357	5,228	1,569	263,69	146,49
12	Kacang kedelai hitam	0,0012	0,186	2,634	0,790	132,83	110,70
13	Kacang kedelai	0,0015	0,224	3,216	0,965	162,21	108,14
14	Kacang hijau	0,0013	0,024	0,192	0,058	9,69	7,45
15	Kacang merah	0,0011	0,026	0,213	0,064	10,76	9,78
16	Kacang merah es	0,0019	0,155	2,172	0,652	109,56	57,67
17	Tempe	0,0013	0,389	5,716	1,715	288,25	221,73
18	Tahu	0,0018	0,285	4,145	1,244	209,06	116,14
Makanan Kaleng							
19	Daging sapi kaleng A1	0,0017	0,566	8,383	2,515	422,77	248,69
20	Daging sapi kaleng A2	0,0018	0,390	5,726	1,718	288,80	160,45
21	Ikan makarel B1	0,0015	0,039	0,411	0,123	20,75	13,84
22	Ikan makarel B2	0,0017	0,042	0,457	0,137	23,04	13,55
23	Ikan makarel B3	0,0017	0,678	10,091	3,027	508,91	299,36
24	Ikan makarel B4	0,0013	0,041	0,447	0,134	22,55	17,35
25	Ikan makarel B5	0,0018	0,021	0,145	0,043	7,29	4,05
26	Ikan sarden C1	0,0015	0,031	0,292	0,088	14,73	9,82
27	Ikan sarden C2	0,0018	0,243	3,505	1,052	176,78	98,21
28	Ikan sarden C3	0,0016	0,077	0,995	0,299	50,20	31,38
29	Ikan sarden C4	0,0014	0,558	8,262	2,479	416,66	297,62
30	Ikan sarden C5	0,0017	0,560	8,292	2,488	418,19	245,99
Daging Segar							
31	Daging sapi	0,0019	0,711	10,578	3,173	533,48	280,78
32	Jantung Sapi	0,0019	0,559	8,290	2,487	418,11	220,06
33	Hati sapi	0,0019	0,210	3,009	0,903	151,74	79,86
34	Usus sapi	0,0014	0,090	1,186	0,356	59,82	42,73
35	Daging kambing	0,0019	0,799	11,918	3,575	601,08	316,36
36	Jantung kambing	0,0013	0,279	4,054	1,216	204,48	157,29
37	Ginjal kambing	0,0012	0,348	5,091	1,527	256,74	213,95

38	Limfa Kambing	0,0019	0,745	11,097	3,329	559,65	294,55
39	Usus Kambing	0,0014	0,044	0,493	0,148	24,84	17,74
40	Hati Kambing	0,0012	0,099	1,322	0,397	66,68	55,57
41	Daging ayam	0,0015	0,267	3,871	1,161	195,25	130,16
42	Jantung ayam	0,0015	0,259	3,740	1,122	188,61	125,74
43	Rempelo ayam	0,0018	0,580	8,596	2,579	433,53	240,85
44	Hati ayam	0,0019	0,058	0,700	0,210	35,33	18,59
45	Usus ayam	0,0012	0,110	1,486	0,446	74,92	62,44
46	Daging Kelinci	0,0016	0,202	2,882	0,865	145,37	90,86
47	Jantung kelinci	0,0014	0,510	7,542	2,263	380,35	271,68
48	Ginjal kelinci	0,0015	0,192	2,731	0,819	137,72	91,81
49	Usus kelinci	0,0015	0,168	2,362	0,708	119,10	79,40
50	Hati kelinci	0,0016	0,244	3,525	1,057	177,77	111,11
51	Limfa kelinci	0,0017	0,485	7,159	2,148	361,04	212,38
	Ikan Segar						
52	Udang	0,0012	0,040	0,439	0,132	22,12	18,44
53	Udang lobster	0,0018	0,559	8,290	2,487	418,11	232,29
54	Kerang	0,0018	0,706	10,511	3,153	530,12	294,51
55	Cumi-cumi	0,0019	0,479	7,071	2,121	356,62	187,69
56	Kepiting	0,0019	0,165	2,328	0,698	117,38	61,78
57	Belut	0,0013	0,151	2,115	0,635	106,68	82,06
58	Dencis	0,0017	0,132	1,825	0,547	92,03	54,14
59	Mujahir	0,0012	0,404	5,933	1,780	299,20	249,33
60	Selar	0,0015	0,403	5,917	1,775	298,40	198,93
61	Tongkol	0,0018	0,267	3,871	1,161	195,25	108,47
62	Bandeng	0,0016	0,358	5,242	1,573	264,37	165,23
63	Teri	0,0014	0,249	3,596	1,079	181,36	129,54
64	Ikan mas	0,0017	0,049	0,570	0,171	28,76	16,92

Penentuan dilakukan pada potensial konstan $E=0,60$ V vs Ag/AgCl di dalam larutan buffer fosfat



Lampiran 3. Analisis asam urat di dalam makanan dan minuman secara Spektrofotometri UV-Vis: 1 mg sampel dilarutkan dalam 1 ml Li_2CO_3 (4%), 50 μl sampel dilarutkan dalam 150 μl larutan (50 μl o-dianisidin + 5 μl POx + 5 μl UOx + 40 μl Li_2CO_3) dan analisis pada λ 520 nm selama 10 menit

No.	Nama Sampel	Berat sampel (g)	Pengukuran kadar asam urat dalam sampel*				
			Absorban (au)	Standar (mM)	mM	mg	mg/kg sampel
	Sayuran						
1	Bayam hijau	0,0014	0,086	0,183	0,055	9,23	6,59
2	Kangkung	0,0014	ND	ND	ND	ND	ND
3	Brokoli	0,0015	0,110	3,110	0,933	156,83	104,56
4	Daun singkong	0,0013	0,085	0,061	0,018	3,08	2,37
5	Melindo	0,0014	ND	ND	ND	ND	ND
6	Bayam merah	0,0017	ND	ND	ND	ND	ND
7	Bunga kol	0,0019	0,098	1,646	0,494	83,03	43,70
8	Apel	0,0015	0,137	6,402	1,921	322,89	215,26
9	Durian	0,0019	0,109	2,988	0,896	150,68	79,31
10	Alpukat	0,0015	0,126	5,061	1,518	255,24	170,16
	Kacang-kacangan						
11	Kacang tanah	0,0018	0,127	5,183	1,555	261,39	145,22
12	Kacang kedelai hitam	0,0012	ND	ND	ND	ND	ND
13	Kacang kedelai	0,0015	0,111	3,232	0,970	162,98	108,66
14	Kacang hijau	0,0013	0,086	0,183	0,055	9,23	7,10
15	Kacang merah	0,0011	0,086	0,183	0,055	9,23	8,39
16	Kacang merah es	0,0019	ND	ND	ND	ND	ND
17	Tempe	0,0013	0,131	5,671	1,701	285,99	219,99
18	Tahu	0,0018	0,118	4,085	1,226	206,04	114,47
	Makanan Kaleng						
19	Daging sapi kaleng A1	0,0017	0,152	8,232	2,470	415,15	244,21
20	Daging sapi kaleng A2	0,0018	0,131	5,671	1,701	285,99	158,88
21	Ikan makarel B1	0,0015	0,088	0,427	0,128	21,53	14,35
22	Ikan makarel B2	0,0017	0,088	0,427	0,128	21,53	12,66
23	Ikan makarel B3	0,0017	0,166	9,939	2,982	501,25	294,86
24	Ikan makarel B4	0,0013	0,088	0,427	0,128	21,53	16,56
25	Ikan makarel B5	0,0018	0,095	1,280	0,384	64,58	35,88
26	Ikan sarden C1	0,0015	ND	ND	ND	ND	ND
27	Ikan sarden C2	0,0018	0,112	3,354	1,006	169,14	93,96
28	Ikan sarden C3	0,0016	ND	ND	ND	ND	ND
29	Ikan sarden C4	0,0014	0,151	8,110	2,433	409,00	292,14
30	Ikan sarden C5	0,0017	0,152	8,232	2,470	415,15	244,21
	Daging Segar						
31	Daging sapi	0,0019	0,170	10,427	3,128	525,86	276,77
32	Jantung Sapi	0,0019	0,150	7,988	2,396	402,85	212,03
33	Hati sapi	0,0019	0,107	2,744	0,823	138,38	72,83
34	Usus sapi	0,0014	0,094	1,159	0,348	58,43	41,73
35	Daging kambing	0,0019	0,180	11,646	3,494	587,36	309,14
36	Jantung kambing	0,0013	0,117	3,963	1,189	199,89	153,76

37	Ginjal kambing	0,0012	0,125	4,939	1,482	249,09	207,57
38	Limfa Kambing	0,0019	0,175	11,037	3,311	556,61	292,95
39	Usus Kambing	0,0014	0,088	0,427	0,128	21,53	15,38
40	Hati Kambing	0,0012	0,094	1,159	0,348	58,43	48,69
41	Daging ayam	0,0015	0,115	3,720	1,116	187,59	125,06
42	Jantung ayam	0,0015	ND	ND	ND	ND	ND
43	Rempelo ayam	0,0018	0,154	8,476	2,543	427,45	237,47
44	Hati ayam	0,0019	0,089	0,549	0,165	27,68	14,57
45	Usus ayam	0,0012	0,095	1,280	0,384	64,58	53,82
46	Daging Kelinci	0,0016	0,107	2,744	0,823	138,38	86,49
47	Jantung kelinci	0,0014	0,145	7,378	2,213	372,10	265,78
48	Ginjal kelinci	0,0015	ND	ND	ND	ND	ND
49	Usus kelinci	0,0015	0,103	2,256	0,677	113,78	75,85
50	Hati kelinci	0,0016	0,101	2,012	0,604	101,48	63,43
51	Limfa kelinci	0,0017	0,137	6,402	1,921	322,89	189,94
	Ikan Segar						
52	Udang	0,0012	0,088	0,427	0,128	21,53	17,94
53	Udang lobster	0,0018	0,150	7,988	2,396	402,85	223,80
54	Kerang	0,0018	0,160	9,207	2,762	464,35	257,97
55	Cumi-cumi	0,0019	0,140	6,768	2,030	341,35	179,66
56	Kepiting	0,0019	0,102	2,134	0,640	107,63	56,65
57	Belut	0,0013	0,097	1,524	0,457	76,88	59,14
58	Dencis	0,0017	0,098	1,646	0,494	83,03	48,84
59	Mujahir	0,0012	0,127	5,183	1,555	261,39	217,83
60	Selar	0,0015	0,133	5,915	1,774	298,29	198,86
61	Tongkol	0,0018	0,115	3,720	1,116	187,59	104,21
62	Bandeng	0,0016	0,125	4,939	1,482	249,09	155,68
63	Teri	0,0014	0,113	3,476	1,043	175,29	125,20
64	Ikan mas	0,0017	ND	ND	ND	ND	ND

Penentuan dilakukan menggunakan α -dianisidin pada λ 520 nm



Lampiran 4. BIODATA KETUA PENELITI

Nama Lengkap : Prof. Drs. Manihar Situmorang, M.Sc, Ph.D.
 NIP : 131 572 430
 Tempat/Tanggal Lahir : Palipi, 4 Agustus 1960
 Jenis Kelamin : Laki-laki
 Bidang Keahlian : Kimia Analisis (Elektroanalisis dan Biosensor)
 Kantor/Unit Kerja : Jurusan Kimia, FMIPA, Universitas Negeri Medan
 Alamat Kantor : Jl. Willem Iskandar Psr V. Medan, Sumatera Utara
 Kota : Medan Kodepos 20221
 Telepon : (061) 6625970
 Faximile : (061) 6614002
 Alamat Rumah : Jl. Cengkeh No. 12 Perumnas Simalingkar Medan (20141)
 Kota : Medan, Sumatera Utara Kodepos 20141
 Telepon : (061) 8362106
 E-Mail : msitumorang@lycos.com

Pendidikan

No	Perguruan Tinggi	Kota & Negara	Gelar dan Tahun Lulus	Bidang Studi / Keahlian
1.	IKIP Medan	Medan, Indonesia	Drs, 1984	Pendidikan Kimia
2.	University of New South Wales	Sydney, Australia	Diploma, 1989	Chemical Research Technique
3.	University of New South Wales	Sydney, Australia	M.Sc, 1992	Analytical Chemistry.
4.	University of New South Wales	Sydney, Australia	Ph.D, 2001	Analytical Chemistry.

Pengalaman Riset Untuk Bidang Kimia Analisis

No	Nama Tim Peneliti, Judul Penelitian dan Sumber Dana	Tugas Dalam Penelitian	Tahun Anggaran
1.	Situmorang, M., (1992), <i>Enzymatic assay for glucose and cholesterol using flow injection potentiometry with a tungsten wire electrode</i> , M.Sc Thesis, The University of New South Wales, Australia.	Karya Siswa Program S2	1990-1992
2.	Situmorang, M., (1994), <i>Development Of Liquid Chromatography with Electrochemical Detection for Electroactive Compounds</i> , School of Chemistry University of Cincinnati, Ohio, USA.	Research Fellows	1994
3.	Situmorang, M. dan Nurwahyuni, I., (1996), <i>Pemisahan dan Elusidasi Struktur Senyawa Bioaktif Aminofenol Dari Tumbuhan Sibumbun (Euphorbiaceae)</i> , Dibiayai oleh Proyek Pengkajian dan Penelitian Ilmu Pengetahuan Terapan Peneliti Muda, Dirjen Dikti Depdikbud, <i>Laporan Penelitian FPMIPA IKIP Medan</i> .	Ketua Peneliti	1995/1996
4.	Situmorang, M., Nurwahyuni, I. dan Silalahi, S.S., (1996), <i>Potensiometri Penentuan Kolesterol Dalam Sistem Flow Injeksi Analisis</i> , Dibiayai oleh Proyek Pendidikan Tenaga Guru, Dirjen Dikti Depdikbud, <i>Laporan Penelitian FPMIPA IKIP Medan</i> .	Ketua Peneliti	1995/1996
5.	Situmorang, M. dan Nurwahyuni, I., (1997), <i>Isolasi, Elusidasi Struktur Serta Pengujian Aktivitas Senyawa Bioaktif Tumbuhan Sibumbun (Euphorbiaceae)</i> , Dibiayai oleh Proyek Pengkajian dan Penelitian Ilmu Pengetahuan Terapan Peneliti Muda, Dirjen Dikti Depdikbud, <i>Laporan Penelitian FPMIPA IKIP Medan</i>	Ketua Peneliti	1996/1997

6.	Situmorang, M. dan Nurwahyuni, I., (1997), <i>Biosensor Potensiometri Penentuan Kolesterol Dalam Sistem Flow Injeksi Analisis</i> , Dibiayai oleh Proyek Pendidikan Tenaga Akademik, Dirjen Dikti Depdikbud, <i>Laporan Penelitian FPMIPA IKIP Medan</i> .	Ketua Peneliti	1996/1997
7	Situmorang, M., (2001), <i>Development of Enzyme Based Biosensor by Using Electrodeposited Polytyramine</i> , Ph.D Thesis , The University of New South Wales, Sydney, Australia	Karya Siswa Program S3	1997-2000
8.	Situmorang, M. dan Gooding, J.J., (2000), <i>An Enzyme Biosensor for the Analysis of Malic Acid in Wine</i> , Dibiayai oleh Grape and Wine Research and Development Corporation (GWRDC), Australia, <i>Research Report University of New South Wales and Flinders University</i>	Ketua Peneliti	1999/2000
9.	Situmorang, M., (2001), <i>Sintesis Ionofor Azacrown Untuk Membran Elektroda Ion Selektif Penentuan Timbal</i> , Penelitian Dilakukan Dengan Biaya Sendiri, <i>Laporan Penelitian FMIPA Universitas Negeri Medan</i>	Penelitian Mandiri	2001
10	Situmorang, M., Nurwahyuni, I., dan Silitonga, P.M., (2003), <i>Pengembangan Biosensor Elektrokimia, Sebagai Instrumen Analisis untuk Diagnostik Klinis dan Uji Kualitas Air</i> , Dibiayai oleh KNRT Riset Unggulan Terpadu RUT IX 2001 <i>Laporan Penelitian Universitas Negeri Medan, Kementerian Riset dan Teknologi RI, LIPI</i>	Ketua Peneliti	2002-2003
11	Situmorang, M.; Purba, J. dan Nurwahyuni, I., (2004), <i>Rancang Bangun Sensor Potensiometri Dalam Sistem Flow Injeksi Analisis Untuk Penentuan Logam Berat dan Polutan Beracun Dalam Sampel Lingkungan</i> , Dibiayai oleh Penelitian Hibah Bersaing XI, Dirjen Dikti Depdiknas	Ketua Peneliti	2003-2004
12	Situmorang, M.; Silitonga, P.M.; Nurwahyuni, I., (2006), <i>Rancang Bangun Biosensor Elektrokimia Sebagai Instrumen Analisis Untuk Kontrol Kualitas Makanan Dan Minuman</i>	Ketua Peneliti	2006-2008

Daftar Publikasi Berhubungan Dengan Proyek Penelitian (diurutkan dari tahun terkini)

1. Situmorang, M.; Silitonga, P.M.; Nurwahyuni, I., Butar-butur, A., dan Nainggolan, M., (2007), *Rancang Bangun Biosensor Elektrokimia Dalam Sistem Flow Injeksi Analisis Untuk Penentuan Kolesterol Dalam Makanan dan Minuman*, *Jurnal Sain Indonesia* **30(4)**: 125-130
2. Situmorang, M., (2005), *Pembuatan Sensor Potensiometri Dalam Sistem Flow Injeksi Analisis Untuk Penentuan Timbal Menggunakan Ionofor Diazacrown*, *Jurnal Sain Indonesia* **29(2)**: 55-61
3. Situmorang, M.; Purba, J.; dan Nurwahyuni, I., (2004), *Rancang Bangun Sensor Potensiometri Dalam Sistem Flow Injeksi Analisis Untuk Penentuan Timbal*, *Prosiding Semimnar Nasional dan Lokakarya Pengembangan MIPA Pontianak*
4. Situmorang, M.; Purba, J.; Nurwahyuni, I., dan Sinaga, M., (2003), *Pembuatan Membran Elektroda Ion Selektif Melalui Sintesa Ionofor Azacrown*, *Jurnal Penelitian Sainika* **3(2)**: 100-108
5. Situmorang, M.; Gooding, J.J.; Hibbert, D.B. dan Barnett, D., (2002), *The Development of a Pyruvate Biosensor Using Electrodeposited Polytyramine*, *Electroanalysis* **14(1)**: 17-21
6. Situmorang, M.; Gooding, J.J.; Hibbert, D.B. dan Barnett, D., (2001), *Development of Potentiometric Biosensors Using Electrodeposited Polytyramine as the Enzyme Immobilisation Matrix*, *Electroanalysis* **13(18)**: 1469-1474.
7. Gooding, J.J.; Erokhin, P.; Losic, D.; Yang, W.R.; Policarpio, V.; Liu, J.Q.; Situmorang, M.; Ho, F.M.; Hibbert, D.B. dan Shapter, J.G., (2001), *Parameters Important in Fabricating Enzyme Electrodes Using Self-Assembled Monolayers of Alkanethiols*, *Analytical Sciences* **17(1)**: 3-9

8. Gooding, J.J.; Yang, W.R. dan Situmorang, M., (2001), Bioanalytical Experiments for the Undergraduate Laboratory: Monitoring Glucose in Sport Drinks, *Journal of Chemical Education* **78(20)**: 788-790.
9. Situmorang, M. dan Nurwahyuni, I. (2001), Immobilisasi Enzim Dalam Reaktor Untuk Penentuan Kolesterol, *Majalah Kedokteran Nusantara* **34(2)**: 84-89.
10. Situmorang, M., (2001), Teknik Biosensor Elektrokimia Untuk Penentuan Sulfid Di Dalam Minuman Keras, *Jurnal Pendidikan Science* **25(2A)**: 19-28.
11. Nurwahyuni, I. dan Situmorang, M., (2001), Analisis Kandungan Senyawa Bioaktif Sibumbun (Familia: Euphorbiaceae) Dan Pengaruhnya Terhadap Kultur Kedelai, *Jurnal Pendidikan Science* **25(4)**: 11-21.
12. Situmorang, M.; Hibbert, D.B. dan Gooding, J.J., (2000), An Experimental Design Study of Interferences of Clinical Relevance of a Polytyramine Immobilized-Enzyme Biosensor, *Electroanalysis* **12(2)**: 111-119
13. Situmorang, M. dan Gooding, J.J., (2000), New Biosensors for Wine Analysis, *ChemoSense* **2(4)**: 1-3.
14. Situmorang, M., (2000), Uji Perkaratan Logam Tergalvaniser Secara Elektrokimia, *Majalah Pendidikan Science* **24(1)**: 62-71.
15. Gooding J.J.; Situmorang, M.; Erokhin, P. dan Hibbert, D.B., (1999), An Assay for the Determination of the Amount of Glucose Oxidase Immobilised in an Enzyme Electrode, *Analytical Communications* **36(6)**: 225-228
16. Situmorang, M.; Gooding, J.J. dan Hibbert, D.B., (1999), Immobilisation of Enzyme Throughout a Polytyramine Matrix: A Versatile Procedure for Fabricating Biosensors, *Analytica Chimica Acta* **394(2-3)**: 211-223
17. Situmorang, M.; Hibbert, D.B.; Gooding, J.J. dan Barnett, D., (1999), A Sulfite Biosensor Fabricated Using Electrodeposited Polytyramine: Application to Wine Analysis, *Analyst* **124(12)**: 1775-1779.
18. Nurwahyuni, I. dan Situmorang, M., (1999), Reaksi Enzimasi Penentuan Glukosa Dalam Media Kultur Jaringan Tanaman, *Komunikasi Penelitian* **11(4)**: 279-289.
19. Situmorang, M.; Alexander, P.W. dan Hibbert, D.B., (1998), Flow Injection Potentiometry for Enzymatic Assay of Cholesterol With a Tungsten Electrode Sensor, *Talanta* **49(3)**: 639-649
20. Situmorang, M.; Gooding, J.J.; Hibbert, D.B. dan Barnett, D., (1998), Electrodeposited Polytyramine as an Immobilisation Matrix for Enzyme Biosensors, *Biosensors & Bioelectronics* **13(9)**: 953-962.
21. Situmorang, M.; Lee, M.T.B.; Witzeman, K.; dan Heineman, W.R., (1998), Liquid Chromatography With Electrochemical Detection (LC-EC): An Experiment Using 4-Aminophenol, *Journal of Chemical Education* **75(8)**: 1035-1038
22. Situmorang, M. dan Nurwahyuni, I., (1997), Potensiometri Penentuan Glukosa Dalam Sistem Flow Injeksi Analisis, *Indo Kimia* **2(3)**: 39-49
23. Nurwahyuni, I. dan Situmorang, M., (1997), Uji Aktivitas Senyawa Bioaktif Sibumbun Sebagai Bahan Herbisida dan Antibakteri, *Komunikasi Penelitian* **9(1)**: 31-37
24. Situmorang, M; Simanjuntak, A. dan Nurwahyuni, I., (1997), Isolasi Senyawa Bioaktif Aminofenol Dari Tumbuhan Sibumbun (Euphorbiaceae), *Majalah Pendidikan Science* **21(2)**: 23-33
25. Situmorang, M.; Simanjuntak, A. dan Nurwahyuni, I., (1995), Identifikasi Bioaktif Sibumbun (*Euphorbiaceae*) Secara HPLC dan CV dan Uji Bioaktif Terhadap Tanaman Kedelai, *Majalah Pendidikan Science* **20(5)**: 101-109

Lampiran 5. BIODATA ANGGOTA PENELITI 1

Nama Lengkap : Drs. P. Maulim Silitonga, MS
 NIP : 131 477 049
 Tempat/Tanggal Lahir : Taput, 7 September 1959.
 Jenis Kelamin : Laki-laki
 Bidang Keahlian : Biokimia
 Kantor/Unit Kerja : Jurusan Kimia FMIPA Universitas Negeri Medan
 Alamat Kantor : Jl. Willem Iskandar Psr V. Medan Estate, Sumatera Utara
 Kota : Medan Kodepos 20221
 Telepon : (061) 6625970
 Faximile : (061) 6614002
 Alamat Rumah : Jl. Tangkul No. 116 C Medan, Sumatra Utara
 Kota : Medan
 Telepon : (061) 6634505

Pendidikan

No	Perguruan Tinggi	Kota & Negara	Tahun Lulus	Bidang Studi
1.	IKIP Medan	Medan, Indonesia	Sarjana, 1984	Pendidikan Kimia
2.	Institut Pertanian Bogor	Bogor, Indonesia	MS, 1992	Biokimia

Pengalaman Riset

No	Judul Riset	Tabun
1.	Analisis pemanfaatan zeolit alam dalam pengolahan air limbah	1995
2.	Pengaruh piridoksin terhadap kadar immunoglobulin, DNA dan RNA pada ayam broiler	1996
3.	Pengaruh suhu pemanasan dan fermentasui terhadap kandungan asam sianida biji Para (<i>Havea braziliensis</i>)	1997
4.	Penggunaan tepung biji para sebagai makanan tambahan pada ayam broiler	1998
5.	Pengaruh piridoksin terhadap kadar DNA/RNA tikus putih pada masa kehamilan dan laktasi	1999
6	Pengembangan Biosensor Elektrokimia Sebagai Instrumen Analisis Untuk Diagnostik Klinis dan Uji Kualitas Air	2002-2003
	Rancang Bangun Biosensor Elektrokimia Sebagai Instrumen Analisis Untuk Kontrol Kualitas Makanan Dan Minuman	2006-2008

Daftar Publikasi

1. Situmorang, M.; Silitonga, P.M.; Nurwahyuni, I., Butar-butur, A., dan Nainggolan, M., (2007), Rancang Bangun Biosensor Elektrokimia Dalam Sistem Flow Injeksi Analisis Untuk Penentuan Kolesterol Dalam Makanan dan Minuman, *Jurnal Sain Indonesia* 30(4): 125-130
2. Silitonga, P.M, (1994), Pengaruh piridoksin terhadap sintesis antibodi pada ayam broiler, *Majalah Pelangi Pendidikan* 1(1): 25-32.

Lampiran 6. BIODATA ANGGOTA PENELITI 2

Nama Lengkap : Dra. Isnaini Nurwahyuni, M.Sc
 NIP : 131 453 792
 Tempat/Tanggal Lahir : Bandung 23 Mei 1960
 Jenis Kelamin : Perempuan
 Bidang Keahlian : Fisiologi Tumbuhan dan Kultur Jaringan Tanaman
 Kantor/Unit Kerja : Jurusan Biologi FMIPA Universitas Sumatera Utara
 Alamat Kantor : Jl. Bioteknologi No. 1 Kampus USU P. Bulan, Medan
 Kota : Medan Kodepos 20155
 Telepon : (061) 8211050
 Faximile : (061) 8214290
 Alamat Rumah : Jl. Cengkeh No. 12 Perumnas Simalingkar Medan (20141)
 Telepon : (061) 8362106
 E-Mail : inurwahyuni@lvcos.com

Pendidikan

No	Perguruan Tinggi	Kota & Negara	Tahun Lulus	Bidang Studi
1.	Universitas Gajah Mada	Yogyakarta, Indonesia	S. Muda, 1982	Biologi
2.	Universitas Gajah Mada	Yogyakarta, Indonesia	Sarjana, 1984	Botani
3.	Queensland University	Brisbane, Australia	M.Sc, 1990	Plant Tissue Culture

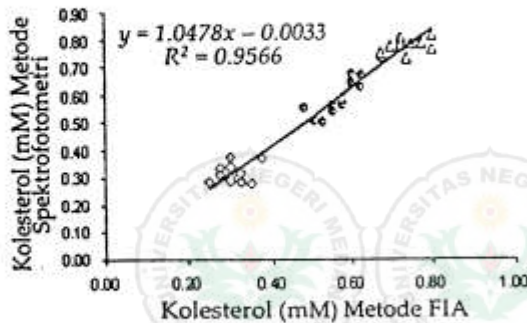
Pengalaman Penelitian

No	Judul Riset	Tugas dlm Penelitian	Tahun
1	Regenerasi <i>In Vitro</i> dan Transformasi Genetik Kedelai Menuju Pembentukan Tanaman Transgenik	Ketua Peneliti	1994-1996
2	Pemisahan dan elusidasi struktur senyawa bioaktif aminofenol dari tumbuhan Sibumbun (<i>Euphorbiaceae</i>)	Anggota Peneliti	1995/1996
3	Isolasi, elusidasi struktur serta pengujian aktivitas senyawa bioaktif tumbuhan Sibumbun (<i>Euphorbiaceae</i>)	Anggota Peneliti	1996/1997
4	Potensiometri penentuan kolesterol dalam sistem flow injeksi analisis	Anggota Peneliti	1995/1996
5	Biosensor potensiometri penentuan kolesterol dalam sistem flow injeksi analisis	Anggota Peneliti	1996/1997
6	Perbanyakan Tanaman Kopi Arabika (<i>Coffea arabica</i> L) Secara Kultur Jaringan	Ketua Peneliti	1997-1998
7	Kultur kalus jeruk manis (<i>Citrus sinensis</i> Brasitepu)	Ketua Peneliti	1999/2000
8	Perbanyakan Tanaman Jeruk Manis (<i>Citrus sinensis</i> Brasitepu) Secara Kultur Jaringan	Ketua Peneliti	2000/2001
9	Uji ketahanan kultur jeruk manis (<i>Citrus sinensis</i> Brasitepu) terhadap salinitas menuju bibit unggul	Ketua Peneliti	2002
10	Upaya perbanyakan tanaman kemenyan sumatrana (<i>Styrax Benzoin Dryander</i>) melalui kultur pucuk	Ketua Peneliti	2002
11	Pengembangan Biosensor Elektrokimia Sebagai Instrumen Analisis Untuk Diagnostik Klinis dan Uji	Anggota Peneliti	2002-2003

	Kualitas Air		
12	Rancang Bangun Sensor Potensiometri Dalam Sistem Flow Injeksi Analisis Untuk Penentuan Logam Berat dan Polutan Beracun Dalam Sampel Lingkungan	Anggota Peneliti	2003-2004
12	Rancang Bangun Biosensor Elektrokimia Sebagai Instrumen Analisis Untuk Kontrol Kualitas Makanan Dan Minuman	Anggota Peneliti	2006-2008

Daftar Publikasi

1. Situmorang, M.; Silitonga, P.M.; Nurwahyuni, I., Butar-butur, A., dan Nainggolan, M., (2007), Rancang Bangun Biosensor Elektrokimia Dalam Sistem Flow Injeksi Analisis Untuk Penentuan Kolesterol Dalam Makanan dan Minuman, *Jurnal Sain Indonesia* **30(4)**: 125-130
2. Situmorang, M.; Purba, J.; dan Nurwahyuni, I., (2004), Rancang Bangun Sensor Potensiometri Dalam Sistem Flow Injeksi Analisis Untuk Penentuan Timbal, *Prosiding Semimnar Nasional dan Lokakarya Pengembangan MIPA Pontianak*
3. Nurwahyuni, I., (2003), Uji ketahanan kultur jeruk manis (*Citrus sinensis* Brasitepu) terhadap salinitas menuju bibit unggul, *Jurnal Scientia* **3(2)**: 75-84
4. Nurwahyuni, I., (2002), Kultur jaringan daun jeruk manis (*Citrus sinensis* Brasitepu) untuk mikropropagasi, *Jurnal Sain Indonesia* **24(1)**: 17-20
5. Situmorang, M. dan Nurwahyuni, I. (2001), Immobilisasi Enzim Dalam Reaktor Untuk Penentuan Kolesterol, *Majalah Kedokteran Nusantara* **34(2)**: 84-89.
6. Nurwahyuni, I. dan Situmorang, M., (2001), Analisis Kandungan Senyawa Bioaktif Sibumbun (Familia: Euphorbiaceae) Dan Pengaruhnya Terhadap Kultur Kedelai, *Jurnal Pendidikan Science* **25(4)**: 11-21.
7. Nurwahyuni, I., (2001), Kultur jaringan daun kopi arabika (*Coffea arabica* L.) dalam media MS diperkaya dengan kombinasi sitokinin dan auksin, *Jurnal Pendidikan Science* **25(2A)**: 29-38
8. Nurwahyuni, I. dan Situmorang, M., (1999), Reaksi enzimasi penentuan glukosa dalam media kultur jaringan tanaman, *Komunikasi Penelitian* **11(4)**: 279-289.
9. Nurwahyuni, I., (1999), Perbanyakkan tanaman kopi arabika (*Coffea arabica* L) secara kultur jaringan, *Komunikasi Penelitian* **11(2)**: 88-102.
10. Nurwahyuni, I. dan Situmorang, M., (1999), Reaksi Enzimasi Penentuan Glukosa Dalam Media Kultur Jaringan Tanaman, *Komunikasi Penelitian* **11(4)**: 279-289.
11. Situmorang, M. dan Nurwahyuni, I. (1997), Potensiometri Penentuan Glukosa Dalam Sistem Flow Injeksi Analisis, *Indo Kimia* **2(3)**: 39-49
12. Nurwahyuni, I., dan Situmorang, M., (1997), Uji aktivitas senyawa bioaktif tumbuhan Sibumbun sebagai bahan herbisida dan antibakteri, *Komunikasi Penelitian* **9(1)**: 31-37
13. Situmorang, M; Simanjuntak, A. dan Nurwahyuni, I. (1997), Isolasi Senyawa Bioaktif Aminofenol Dari Tumbuhan Sibumbun (Euphorbiaceae), *Majalah Pendidikan Science* **21(2)**: 23-33.
14. Nurwahyuni, I. dan Situmorang, M. (1997), Uji Aktivitas Senyawa Bioaktif Sibumbun Sebagai Bahan Herbisida dan Antibakteri, *Komunikasi Penelitian* **9(1)**: 31-37



Gambar 3. Hasil analisis kadar kolesterol dalam makanan berlemak ditentukan secara biosensor elektrokimia dalam sistem FIA dan metode standar spektrofotometri secara reaksi enzimas: (◇) daging segar, (⊙) daging kaleng, dan (△) minuman kaleng berlemak.

total kolesterol di dalam makanan bervariasi, yaitu berada pada skala konsentrasi 1,8-8 mM, maka beberapa sampel dapat dianalisis tanpa pengenceran, kecuali pada sampel yang mempunyai kadar kolesterol sangat tinggi (>7 mM kolesterol) harus membutuhkan pengenceran. Karena kolesterol sukar larut di dalam air, maka masih dibutuhkan perlakuan sampel dengan cara melarutkan sampel di dalam larutan pengemulsi 1% triton X-100 dan 1% isopropanol yang tidak mengganggu reaksi enzimas, sehingga reaksi redoks dapat berlangsung sempurna. Dari uji aktifitas enzim dan reaksi redoks diketahui bahwa kehadiran pengemulsi 1% triton X-100 dan 1% isopropanol tidak mempengaruhi aktifitas enzim dan deteksi potensiometri di dalam sel elektrokimia.

Penentuan Kolesterol dalam Makanan dan Minuman. Biosensor elektrokimia dalam sistem FIA diaplikasikan untuk penentuan kolesterol dalam berbagai jenis makanan seperti pada sampel daging segar, daging kaleng, dan minuman kaleng berlemak. Penganalisisan sampel dilakukan dengan menggunakan metode biosensor dan metode spektrofotometri sebagai perbandingan. Hasil pengukuran kadar kolesterol di dalam sampel menggunakan biosensor hampir sama dengan kadar kolesterol di dalam sampel menggunakan metode spektrofotometri. Hasil pengukuran dengan menggunakan biosensor kebanyakan lebih tinggi di banding dengan metode standar disebabkan oleh keakuratan metode biosensor lebih baik dibanding metode spektrofotometri. Untuk meyakinkan apakah analisis penentuan kolesterol dalam sampel dengan menggunakan metode biosensor memiliki kesamaan dengan analisis kolesterol menggunakan metode spektrofotometri maka dilakukan perbandingan hasil analisis kedua metode analisis seperti diperlihatkan pada Gambar 3, koefisien koerlasi $R^2 = 0.956$. Dapat dinyatakan bahwa metode analisis biosensor

elektrokimia dalam sistem FIA dapat dipergunakan untuk penentuan asam urat di dalam sampel makan dan minuman. Metode analisis yang dikembangkan dalam penelitian ini memiliki beberapa kelebihan bila dibandingkan dengan metode analisis lain seperti metode standar spektrofotometri. Kadar kolesterol di dalam sampel berturut-turut pada sampel daging segar (0,25-0,35 mM/g sampel), daging kaleng (0,50-0,60 mM/g sampel), dan minuman kaleng berlemak (0,58-0,80 mM). Metode analisis biosensor memiliki sensitifitas yang cukup tinggi, yaitu dapat menentukan kolesterol di dalam sampel pada konsentrasi rendah, yaitu pada konsentrasi 0,1 mM kolesterol. Metode analisis mempunyai kecepatan analisis tinggi, yaitu kan kadar kolesterol di dalam satu sampel, dengan langkah analisis yang sederhana.

Penutup

Berdasarkan hasil penelitian disimpulkan bahwa metode analisis biosensor elektrokimia dalam sistem FIA yang dikembangkan memberikan respon yang baik terhadap kolesterol. Biosensor dengan deteksi potensiometri dapat dipergunakan untuk penentuan kolesterol di dalam sampel makanan dan minuman. Metode analisis menunjukkan linearitas pengukuran lebar (0,005-5,0 mM kolesterol), slope 58,29 mV/perdekade konsentrasi kolesterol, dan sangat sensitif terhadap kolesterol dengan batas deteksi 0,001 mM kolesterol. Biosensor telah diaplikasikan untuk penentuan kolesterol di dalam sampel seperti pada sampel daging segar (0,25-0,35 mM/g sampel), daging kaleng (0,50-0,60 mM/g sampel), dan minuman kaleng berlemak (0,58-0,80 mM). Metode FIA sangat sederhana, menggunakan komponen instrumen yang relatif murah, dan sangat baik dipergunakan untuk mengontrol kualitas kolesterol di dalam makanan dan minuman.

Ucapan Terima Kasih

Terima kasih kepada Proyek Penelitian Hibah Bersaing XIV tahun 2006, Proyek Peningkatan Penelitian Pendidikan Tinggi, Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi, Departemen Pendidikan Nasional, atas dukungan dana sehingga penelitian ini dapat dilaksanakan.

Daftar Pustaka

- Akyilmaz, E., Sezgin, M.K., Dinckaya, E. (2003) A biosensor based on urate oxidase-peroxidase coupled enzyme system for uric acid determination in urine. *Talanta*, 61: 73-79

15. Situmorang, M. dan Nurwahyuni, I. (1996), Potensiometri penentuan glukosa dalam sistem flow injeksi analisis, *Indo Kimia* 2(3):39-49.
16. Nurwahyuni, I., Munir, E., dan Riyani, Y., (1996), Perbanyak Tanaman Anggrek *Dendrobium sp.* secara Kultur jaringan, *Komunikasi Penelitian* 8(4): 331-337.
17. Nurwahyuni, I., Sudradjat, R., Miftahudin, dan Wibowo, N.L., (1996), Potensi Limbah Tomat Sebagai Nutrisi Tanaman Hydroponik, *Komunikasi Penelitian* 8(2): 114-122
18. Ratnadewi, D., Andriani, W., dan Nurwahyuni, I., (1996), Studi embriogenesis pada *Glicine max* dan *G. tomentella*, *J. Il. Pert. Indon.* 6(1): 22-26.
19. Situmorang, M.; Simanjuntak, A. dan Nurwahyuni, I., (1995), Identifikasi Bioaktif Sibumbun (*Euphorbiaceae*) Secara HPLC dan CV dan Uji Bioaktif Terhadap Tanaman Kedelai, *Majalah Pendidikan Science* 20(5): 101-109
20. Situmorang, M.; Simanjuntak, A. dan Nurwahyuni, I., (1995), Identifikasi biokatif tumbuhan Sibumbun (*Euphorbiaceae*), secara HPLC dan CV dan uji bioaktif tyerhadap tanaman kedelai, *Majalah Pendidikan Science* 20(5): 101-109
21. Nurwahyuni, I., dan Tjondronegoro, P., (1994), Induksi kalus dan regenerasi tanaman *Dioscorea composita* Hemsl, *Hayati* 1: 15-17.



Lampiran 7. DAFTAR PUBLIKASI DAN DRAFT PUBLIKASI

1. Nmanihar Situmorang; Pasar Maulim Silitonga; Isnaini Nurwahyuni., Butar-butur, A., dan Nainggolan, M., (2007), Rancang Bangun Biosensor Elektrokimia Dalam Sistem Flow Injeksi Analisis Untuk Penentuan Kolesterol Dalam Makanan dan Minuman, *Jurnal Sain Indonesia* **30(4)**: 125-130
2. Manihar Situmorang; Pasar Maulim Silitonga; Isnaini Nurwahyuni; Toni Hitler Siregar; Rumondang Simatupang; and Herlina Krisnawati, (2008), Development Of Uric Acid Biosensor For The Determination Of Uric Acid In Various Types Of Food Samples, *Draft Paper for Submission to Talanta (International Journal)*
3. Manihar Situmorang; Pasar Maulim Silitonga; Isnaini Nurwahyuni; Baxa Jose Rijal Sinaga; Indah Friani Situmorang; dan Fernando Marpaung (2008), Rancang Bangun Strip Biosensor Untuk Penentuan Asam Urat (*In Pereparation*)



DEPARTEMEN PENDIDIKAN NASIONAL
UNIVERSITAS NEGERI MEDAN
(STATE UNIVERSITY OF MEDAN)
LEMBAGA PENELITIAN
(RESEARCH INSTITUTE)

Jl. W. Iskandar Psr. V-kotak Pos No.1589 – Medan 20221 Telp. (061) 6636757, 6614002, 6613319.e-mail:lpunimed@Indo.net.Id

SURAT PERJANJIAN KERJA
No. 140/H33.8/KEP/PL/2008

Pada hari ini Senin tanggal empat belas bulan April tahun dua ribu delapan, kami yang bertanda tangan di bawah ini:

1. Dr. Ridwan A. Sani, M.Si :Ketua Lembaga Penelitian Universitas Negeri Medan, dan atas nama Rektor Unimed, dan dalam perjanjian ini disebut PIHAK PERTAMA.
2. Prof.Drs. Manihar Situmorang, M.Sc,Ph.D :Dosen FMIPA bertindak sebagai Peneliti/Ketua pelaksana penelitian, selanjutnya disebut PIHAK KEDUA.

Kedua belah pihak secara bersama-sama telah sepakat mengadakan Surat Perjanjian Kerja (SPK) untuk melakukan penelitian sebagai berikut :

Pasal 1

Berdasarkan SP2HP Tahun Anggaran 2008 DP2M Dirjen Dikti Depdiknas, tanggal 6 Maret 2008 Nomor : 003/SP2H/PP/DP2M/III/2008, PIHAK PERTAMA memberi tugas kepada PIHAK KEDUA dan PIHAK KEDUA menerima tugas tersebut untuk melaksanakan/mengkoordinasi pelaksanaan penelitian Hibah Bersaing Lanjutan berjudul :

"Rancang Bangun Biosensor Elektrokimia Sebagai Instrumen Analisis Untuk Kontrol Kualitas Makanan dan Minuman."

Yang berada di bawah tanggung jawab/yang diketahui oleh : PIHAK KEDUA dengan masa kerja 8 (delapan) bulan, terhitung sejak diterbitkannya SP2H Dirjen Dikti dan SPK ini ditanda tangani .

Pasal 2

1. PIHAK PERTAMA memberikan dana penelitian tersebut pada pasal 1 sebesar Rp. 45.000.000,- (Empat puluh lima juta Rupiah) dilaksanakan secara bertahap.
- 2.Tahap pertama sebesar 70% yaitu Rp.31.500.000,- (Tiga puluh satu juta lima ratus ribu rupiah) dibayarkan sewaktu Surat Perjanjian Kerja ini ditandatangani oleh kedua belah pihak.
- 3.Tahap kedua sebesar 30% yaitu Rp.13.500.000,- (Tiga belas juta lima ratus ribu rupiah) dibayarkan setelah PIHAK KEDUA menyerahkan laporan hasil penelitian kepada PIHAK PERTAMA.

Pasal 3

1. PIHAK KEDUA mengajukan/menyerahkan rincian anggaran biaya (RAB) pelaksanaan penelitian sesuai dengan besarnya dana penelitian yang telah disetujui oleh Dikti dan alokasi dana mengikuti peraturan yang berlaku.
2. Semua kewajiban yang berkaitan dengan pengelolaan keuangan dan aset Negara termasuk kewajiban memungut dan menyetorkan pajak dibebankan kepada PIHAK KEDUA.

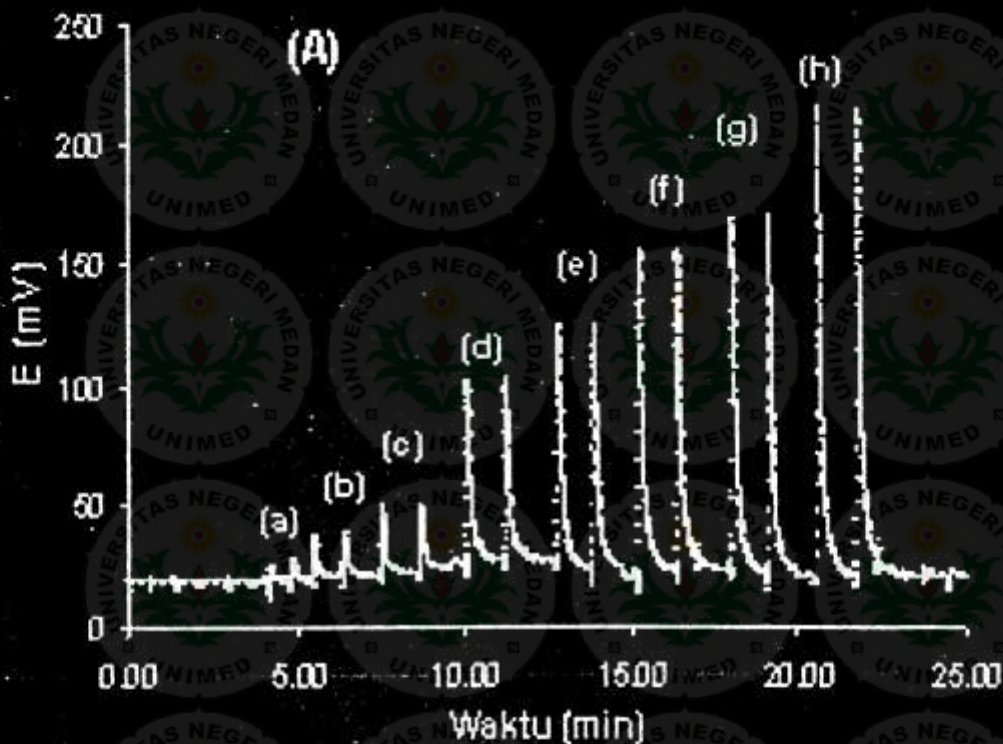


**DRAFT ARTIKEL ILMIAH
DARI HASIL PENELITIAN**

ISSN 0853-3792
Volume 30, Nomor 4
Oktober - Desember 2006

JURNAL SAINS INDONESIA

Memuat Hasil Penelitian Sains dan Matematika, Teori dan Penerapannya



Diterbitkan Sekali Tiga Bulan Oleh
Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Universitas Negeri Medan

Rancang Bangun Biosensor Elektrokimia dalam Sistem Flow Injeksi Analisis untuk Penentuan Kolesterol dalam Makanan dan Minuman

Manihar Situmorang¹, Pasar M. Silitonga¹, Isnaini Nurwahyuni², Arikles Butarbutar¹, dan Marlina Nainggolan¹

¹Jurusan Kimia, FMIPA, Universitas Negeri Medan
Jl. Willem Iskandar Pasar V, Medan, Sumatera Utara, Indonesia 20221

²Departemen Biologi, FMIPA, Universitas Sumatera Utara
Jl. Bioteknologi No. 1 Kampus USU Padang Bulan Medan, Sumatera Utara, Indonesia 20155

Abstract *The design of electrochemical biosensor in a flow injection analysis for quality control of food and beverages is explained. The design of the biosensor is constructed by integrating of enzyme (cholesterol oxidase, and peroxidase) with potentiometric detection mode in a flow injection analysis (FIA) system. The optimum conditions of the experiment are obtained by using of redox mediator of 5 mM K₄Fe(CN)₆, carrier stream of 10 mM phosphate buffer pH 6.0, flow rate of 1.5 mL/second, and 50 μ L of injection volume. The design of electrochemical biosensor in a FIA system developed in this study gave sensitive response to cholesterol and uric acid. The detection linearity to cholesterol lies between 1 μ M – 5 mM cholesterol, slope 58.29 mV/per decade concentration of cholesterol, and the detection limit of 1 μ M cholesterol. The biosensor have been applied for the determination of cholesterol in various samples such as fresh meats (0.25-0.35 mM/g sample, candied meat (0.5-0.6 mM/g sample), and fatty beverages (0.58-0.8 mM). [THE DESIGN OF ELECTROCHEMICAL BIOSENSOR IN A FLOW INJECTION ANALYSIS FOR THE DETERMINATION OF CHOLESTEROL IN FOOD AND BEVERAGES] (J. Sains Indon., 30(4): 125-130, 2006)*

Kata kunci:
Analysis, biosensor, potentiometry, flow injection analysis (FIA), cholesterol, food, beverage

Pendahuluan

Kebutuhan akan instrumen analisis yang memiliki daya analisis akurat, selektif, sensitif, cepat dan sederhana untuk penentuan kolesterol di dalam makanan dan minuman sangat diperlukan karena dapat memberikan informasi yang tepat tentang komponen nutrisi, khususnya senyawa kolesterol yang diindikasikan sebagai penyebab penyakit, sehingga memberikan manfaat yang besar pada produsen dan konsumen di dalam produksi dan pemilihan makanan dan minuman yang layak untuk dikonsumsi. Telah diketahui adanya korelasi positif antara kadar total kolesterol serum dengan penyakit jantung koroner, dan kadar kolesterol serum tinggi merupakan indikator ketidak-normalan metabolisme lemak (Sniderman dan Cianflone, 1999). Apabila metabolisme kolesterol terganggu, kolesterol serum terakumulasi dalam bentuk kolesterol ester pada dinding arteri yang dapat mengakibatkan penyakit arteriosklerosis dan darah tinggi (Gaziano, dkk. 1999; Assmann, dkk.1999). Permasalahan yang dihadapi adalah sulitnya mendapatkan instrumen analisis yang akurat, selektif dan sensitif terhadap kolesterol sehingga kontrol kualitas makanan dan minuman sulit dilakukan oleh industri makanan dan minuman secara reguler, khususnya industri

skala kecil yang belum masional tetapi dikonsumsi oleh masyarakat banyak.

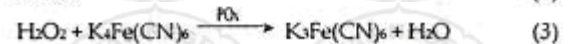
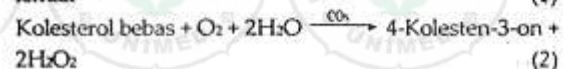
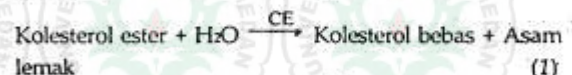
Metode analisis yang dipergunakan untuk menentukan kolesterol diantaranya metode kolorimetri (Park, 1999), metode kromatografi (Emara, dkk. 1999; Botsoglou, dkk. 1998) dan metode spektrofotometri (Amundson dan Zhou, 1999). Umumnya penentuan kolesterol dilakukan menggunakan reaksi enzimasi dengan kolesterol oksidase menghasilkan hidrogen peroksida yang dapat bereaksi dengan senyawa pengabsorpsi seperti o-dianisidin menghasilkan senyawa berwarna yang dapat ditentukan dengan UV-Vis (Martin, dkk. 2003, Singh, dkk, 2004, Brahim, dkk. 2001). Permasalahan utama analisis spektrofotometri adalah pengukuran yang kurang sensitif karena sulit memilih senyawa kimia pengabsorpsi yang tepat. Zat atau senyawa kimia pengabsorpsi kebanyakan bersifat karsinogenik sehingga tidak aman bagi pengguna di laboratorium.

Pengembangan biosensor menggunakan komponen biologi untuk penentuan kolesterol sangat menarik dalam kimia analisis dan sangat tepat untuk penentuan sampel makanan dan minuman. Prinsip dasar biosensor adalah mengintegrasikan komponen biologi aktif

dengan *transducer* untuk menghasilkan signal elektronik yang dapat diukur (Hall, 1991). Biosensor merupakan instrumen analisis yang sangat penting karena mempunyai daya analisis selektif dan sensitif terhadap analit sehingga dapat menentukan kadar senyawa pada konsentrasi sangat rendah. Peralatan ini mempunyai kelebihan dalam kesederhanaan penganalisisan karena penentuan biasanya dilakukan tanpa perlakuan sampel sehingga mudah dilakukan oleh orang yang kurang terampil. Disain instrumen dengan deteksi elektrokimia sangat sederhana dan handal, bila dirangkaikan dengan komponen biologi aktif pada transduser akan menjadikan penganalisisan menjadi sangat selektif, sensitif dan akurat (Vo-Dingh dan Cullum, 2000). Komponen-komponen biologi yang dapat dipergunakan untuk pengembangan biosensor diantaranya enzim (Liang dan Yang, 2000; Karube dan Nomura, 2000), mikroorganisme (Konig, dkk. 1999), jaringan tanaman dan hewan (Campanella, dkk. 1990; Wijesuriya dan Rechnitz, 1993). Sel dan kultur jaringan tanaman yang terdapat pada kelapa (Lima, dkk. 1997), kentang (Takemoto, dkk. 1997), asparagus (Oungpipat, dkk. 1995), jeruk (Horie dan Rechnitz, 1995), bayam (Qin, dkk. 1999), kedelai (Bassi dan McGrath, 1999) dan apel (Cummings, dkk. 1998) mengandung enzim yang dapat digunakan sebagai komponen biosensor. Biosensor elektrokimia dengan deteksi potensiometri mempunyai kelebihan dalam hal sensitifitas, selektifitas dan linieritas pengukuran. Penentuan secara amperometri didasarkan pada pengukuran arus (i) dalam sel elektrokimia, sedangkan pengukuran potensiometri didasarkan pada pengukuran potensial (E) di dalam reaksi redoks (Skoog dan Leary, 1992). Deteksi amperometri mempunyai kelebihan dalam sensitifitas dan selektifitas penganalisisan sehingga penentuan secara elektrokimia masih didominasi oleh metode amperometri (Albert, dkk. 2000). Metode potensiometri sangat menarik terutama dalam hal lebar skala linieritas pengukuran sehingga dapat menentukan senyawa konsentrasi rendah sampai tinggi, serta menggunakan peralatan sederhana dan murah, misalnya pH meter yang dapat dijangkau oleh hampir semua laboratorium (Situmorang, dkk. 1998). Untuk meningkatkan sensitifitas dan stabilitas biosensor diperlukan teknik immobilisasi agar komponen biologi sangat dekat terhadap transduser. Beberapa metode yang dipergunakan untuk mengimmobilisasi komponen biologi diantaranya adsorpsi, pengikatan fisik (*entrapment*), pengikatan secara kimia (*crosslinking and self-assembly*) dan secara elektrokimia (Cosnier, 1999). Pemilihan matriks dalam disain biosensor sangat penting karena berhubungan dengan stabilitas biosensor, dapat berupa polimer atau gel (Yao dan Takashima,

1998). Untuk menghasilkan lapisan matriks dengan keterulangan tinggi maka sangat baik bila menggunakan polimer yang dibuat melalui elektropolimerisasi, karena teknik polimerisasi elektrokimia dapat menghasilkan lapisan tipis yang homogen dengan ketebalan sama dan merata (Emr dan Yacynych, 1995).

Penelitian yang dilakukan adalah membuat rancang bangun biosensor elektrokimia sebagai instrumen analisis untuk kontrol kualitas makanan dan minuman. Penelitian mencakup penggunaan enzim sebagai komponen biologi aktif pada transduser untuk penentuan kolesterol. Komponen-komponen, enzim kolesterol oksidase dan peroksidase diintegrasikan dengan elektroda, kemudian dirangkai dengan deteksi elektrokimia potensiometri dalam sistem flow injeksi analisis (FIA) untuk kontrol kualitas makanan dan minuman. Prinsip dasar biosensor penentuan kolesterol reaksi enzimas digambarkan pada persamaan reaksi 1-3, yaitu berdasarkan reaksi katalisis kolesterol ester menjadi kolesterol bebas dan asam lemak oleh kehadiran enzim kolesterol esterase (CE). Selanjutnya kolesterol dioksidasi menjadi kolestenon dan hidrogen peroksida (H_2O_2) oleh kehadiran enzim kolesterol oksidase (CO_x). Karena hidrogen peroksida tidak dapat dideteksi langsung secara potensiometri maka sistem elektrokimia dibuat dalam deteksi tidak langsung dengan cara mereduksi atau mengoksidasi H_2O_2 dengan redoks mediator $K_4Fe(CN)_6$ oleh kehadiran enzim peroksidase (PO_x) agar menghasilkan potensial yang dapat dideteksi secara potensiometri.



Perubahan ferosianida menjadi ferisianida dideteksi secara potensiometri dalam sistem FIA. Potensial redoks dideteksi di dalam sel elektrokimia menggunakan elektroda W vs Ag/AgCl, yaitu potensial yang terbentuk secara stoikiometri setara dengan konsentrasi kolesterol di dalam sampel.

Bahan dan Metode

Tempat Penelitian. Penelitian dilakukan di Laboratorium Kimia FMIPA Universitas Negeri Medan. Metode penelitian meliputi zat dan bahan, peralatan, dan prosedur penelitian.

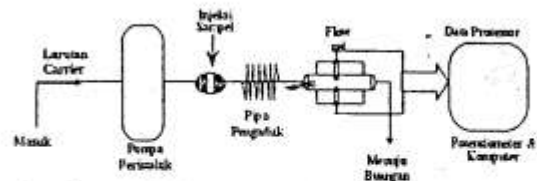
Zat dan Bahan. Bahan kimia yang dipergunakan dalam penelitian ini adalah senyawa proanalisis (PA) diantaranya kolesterol (99%+), kalium ferosianida, kalium klorida,

isopropanol, Triton X-100 diperoleh dari Sigma Chem. Co. Enzim yang digunakan dalam penelitian adalah kolesterol esterase (CE) 200 unit/mg dari *porcine pancreas* (EC 3.1.1.13), kolesterol oksidase (COx) 33 unit/mg dari *pseudomonas* (E.C.1.1.3.6), dan peroksidase (POx) 175 unit/mg dari *horse radish* (E.C.1.11.1.7.2). Berbagai jenis zat lain diperoleh dari Sigma Chem. Co., Ajac Chem., Merk dan BioLab

Perlakuan. Peralatan yang dipergunakan adalah pompa peristaltik (Julabo), potensiometer (Keithley 199 DMM, USA), elektroda wolfram (W) dan Ag/AgCl (BAS) di dalam sel elektrokimia (flow sel) yang dirangkai dengan mikrokomputer (Powerlab ADI Instrumen, Australia). Peralatan pendukung adalah *water bath thermostat*, pipa selang silika 0,1 - 0,2 mm (Fison Co.), dan jarum suntik mikro (Hamilton Co.). Sistem flow injeksi (FIA) dirangkai dengan mengintegrasikan pompa peristaltik, sel elektrokimia di dalam flow sel, dan detektor seperti diperlihatkan pada Gambar 1.

Prosedur Penelitian. Prosedur penelitian meliputi penyediaan larutan, pembuatan biosensor, perlakuan sampel dan analisis secara FIA. Larutan enzim dibuat dengan cara melarutkannya di dalam air sesuai dengan unit yang dibutuhkan. Larutan buffer fosfat 10 mM dibuat dari $\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ dilarutkan dalam aquades dan pH diatur menggunakan KOH. Redoks Mediator Ferrosianida dibuat dengan cara melarutkan $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ dalam buffer fosfat (10 mM, pH 6,0) yang sudah bebas oksigen. Teknik pembuatan larutan kolesterol dan larutan buffer untuk reaksi enzimas penentuan kolesterol dijelaskan secara terperinci pada studinya sebelumnya (Situmorang, dkk. 1998), yaitu menggunakan 1% isopropanol dan 1% Triton X-100. Stok larutan kolesterol standar disimpan di dalam kulkas (4°C) bila tidak digunakan.

Untuk mendapatkan kondisi optimum dilakukan prosedur optimasi terhadap beberapa faktor yang sangat mempengaruhi respon elektroda dalam sistem FIA. Faktor-faktor yang dioptimasi adalah konsentrasi redoks mediator, pH larutan buffer, kecepatan laju alir, volume injeksi sampel, konsentrasi surfaktan, dan reaksi inkubasi enzim. Optimasi pengaruh konsentrasi redoks mediator ferrosianida terhadap sensitivitas elektroda dilakukan dengan cara menyuntikkan 50 μl larutan standar H_2O_2 kedalam carrier stream yang mengandung ferrosianida pada skala konsentrasi 0.1-10 mM $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$. Respon yang memberikan potensial tertinggi dipilih sebagai kondisi optimum, dan selanjutnya digunakan dalam prosedur optimasi parameter yang lain. Optimasi terhadap pH larutan buffer dilakukan dengan variasi pH larutan carrier stream pada skala pH (4.5-8.0) kemudian menyuntikkan 1 mM H_2O_2 standar



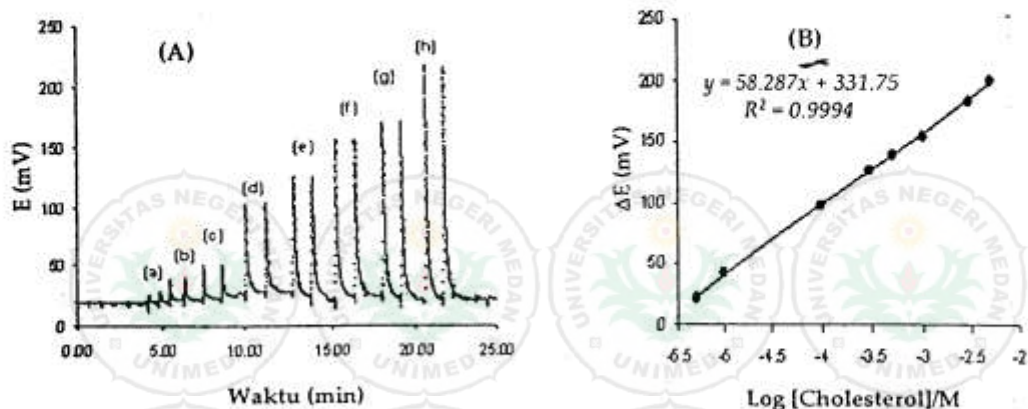
Gambar 1. Disain rancang bangun biosensor elektrokimia dalam sistem flow injeksi analisis untuk penentuan kolesterol rat.

kemudian potensial reaksi redoks (E) di ukur untuk mencari kondisi yang paling optimum. Optimasi laju alir larutan carrier stream dilakukan dengan variasi kecepatan 1.0-3.0 ml/menit dengan cara mengatur kecepatan laju air pada kontrol pompa peristaltik, kemudian menyuntikkan 1 mM H_2O_2 standar ke dalam sistem FIA. Optimasi jumlah volume sampel dilakukan pada variasi volume penyuntikan (10-100) μl H_2O_2 standar. Potensial elektroda diukur untuk mendapatkan bentuk dan tinggi puncak kromatogram FIA paling simetris dan sensitif. Optimasi inkubasi enzim dilakukan pada 1-20 menit, potensial diukur untuk mendapatkan bentuk dan tinggi puncak kromatogram FIA yang paling simetri dan sensitif.

Penentuan kolesterol dilakukan menggunakan biosensor elektrokimia dalam sistem FIA seperti dirangkaikan pada Gambar 1. Analisis kolesterol dilakukan dengan cara menyuntikkan 50 μl larutan standar seri ke dalam injeksi sampel, dan reaksi enzimas diamati dengan cara pengukuran signal (potensial elektroda, E) menggunakan mikrokomputer. Signal selanjutnya diubah menjadi konsentrasi kolesterol (mM). Selanjutnya biosensor diaplikasikan untuk penentuan kolesterol di dalam sampel makanan berupa daging segar dan daging kaleng. Sebagai pembandingan terhadap metode analisis yang dikembangkan maka dilakukan penentuan kolesterol secara spektrofotometri dengan menggunakan reaksi enzimas. Hasil analisis dibandingkan untuk meyakinkan ketepatan metode analisis biosensor dibandingkan dengan metode analisis standar.

Hasil dan Pembahasan

Respon Biosensor terhadap Kolesterol. Pengamatan terhadap respon biosensor elektrokimia terhadap kolesterol dilakukan berdasarkan besarnya potensial yang terdapat pada sel elektrokimia yang berasal dari reaksi oksidasi kolesterol oleh adanya reaksi enzimas pada permukaan elektroda. Kolesterol dioksidasi menjadi kolestenon dan hidrogen peroksida yang dapat dideteksi secara tidak langsung menggunakan redoks mediator seperti di-



Gambar 2. (A) Bentuk FIA-gram untuk: (a) 0,005 mM, (b) 0,01 mM, (c) 0,1 mM, (d) 0,3 mM, (e) 0,5 mM, (f) 1,0 mM, (g) 3,0 mM, (h) dan 5,0 mM kolesterol standar; (B) Kurva kalibrasi larutan kolesterol standar merupakan rata-rata 3 ulangan. Kondisi percobaan: menggunakan 5 mM $K_4Fe(CN)_6$ dalam buffer fosfat pH 6,0 yang mengandung 1 unit/ml Peroksidase (POx); Volume injeksi 50 μ l, laju alir 1,5 ml/min.

perlihatkan pada persamaan 1 dan 2 dan dideteksi secara potensiometri dalam flow sel dalam sistem FIA. Penggunaan redoks mediator sekaligus berfungsi untuk memperbesar (amplifikasi) potensial elektroda yang terbentuk sehingga dapat dideteksi secara potensiometri. Senyawa H_2O_2 yang dihasilkan dalam reaksi oksidasi kolesterol direduksi oleh redoks mediator $[Fe(CN)_6]^{4-}$ menghasilkan senyawa $[Fe(CN)_6]^{3-}$, yaitu dengan kehadiran enzim peroksidase (POx) di dalam larutan sebagai katalis dalam reaksi perubahan hidrogen peroksida sehingga terjadi reaksi redoks. Potensial redoks (E) yang terjadi dari perubahan $[Fe(CN)_6]^{3-}/[Fe(CN)_6]^{4-}$ dapat dideteksi secara potensiometri pada permukaan elektroda W vs Ag/AgCl. Potensial redoks yang terbentuk adalah merupakan hasil perubahan konsentrasi $[Fe(CN)_6]^{3-}/[Fe(CN)_6]^{4-}$ mengikuti persamaan Nernst. Besarnya E yang terbentuk adalah setara dengan konsentrasi kolesterol di dalam sampel. Respon biosensor dalam sistem FIA terhadap analit dilakukan untuk mengetahui apakah biosensor memberikan respon yang sama pada penentuan H_2O_2 standar dan terhadap kolesterol dalam reaksi enzimasi. Dari hasil diketahui bahwa elektrokimia dalam sistem FIA memberikan respon yang baik terhadap H_2O_2 dan kolesterol. Meningkatnya konsentrasi hidrogen peroksida yang disuntikkan ke dalam sistem FIA menunjukkan peningkatan potensial elektroda, dan respon yang hampir sama juga dihasilkan apabila dilakukan reaksi enzimasi penentuan kolesterol.

Optimasi Sistem FIA. Untuk mendapatkan respon FIA yang optimum maka dilakukan optimasi terhadap sistem FIA dengan menggunakan larutan standar hidrogen peroksida, terutama untuk parameter-parameter penentu untuk mendapatkan signal yang optimum reaksi enzimasi untuk penentuan kolesterol. Kondisi

percobaan metode potensiometri dalam sistem FIA yang optimum untuk masing-masing parameter adalah kondisi percobaan yang optimum adalah menggunakan redoks mediator 5 mM $K_4Fe(CN)_6$, carrier stream 10 mM buffer fosfat pH 6,0, laju aliran carrier stream 1,5 mL/menit, volume injeksi dampel 50 μ L.

Biosensor Penentuan Kolesterol. Biosensor dalam sistem FIA memberikan respon yang sensitif terhadap kolesterol. Bentuk FIA-gram penentuan kolesterol diperlihatkan pada Gambar 2A. Potensial yang terbentuk, yaitu berdasarkan pengukuran puncak FIA-gram diplot terhadap waktu. Puncak FIA-gram meningkat secara linier terhadap konsentrasi kolesterol sampel yang disuntikkan. Respon FIA terhadap kolesterol sangat cepat, yaitu dua menit per-sampel, sudah termasuk waktu yang diperlukan antara penyuntikan satu sampel dengan sampel yang lain (interval). Dengan demikian, dalam keadaan normal biosensor mampu menganalisis kolesterol sebanyak 20 sampel per-jam.

Kurva kalibrasi larutan kolesterol standar diperlihatkan pada Gambar 2B. Linieritas pengukuran berada pada skala konsentrasi 0,005-5,0 mM kolesterol, slop 58,29 mV/ konsentrasi kolesterol. Lebarnya linieritas pengukuran yang mencakup konsentrasi rendah sampai tinggi sangat menguntungkan untuk penentuan kolesterol, karena sudah dapat mencakup kadar kolesterol rendah dan tinggi yang terdapat pada sampel. Biosensor yang dikembangkan dalam penelitian ini mempunyai kemampuan analisis lebih sensitif dan skala linearitas pendeteksian lebih lebar bila dibandingkan dengan deteksi yang dilakukan pada penelitian sebelumnya (Situmorang dkk, 1998). Biosensor sangat sensitif terhadap kolesterol yaitu dapat menentukan kolesterol konsentrasi sangat rendah, dengan deteksi batas 0,001 mM kolesterol. Karena kadar

- Albert, K.J., Lewis, N.S., Schauer, C.L., Sotzing, G.A., Stitzel, S.E., Vaid, T.P., Walt, D.R. (2000) Cross-reactive chemical sensor arrays. *Chem. Rev.*, 100: 2595-2626
- Amundson, D.M., Zhou, M.J. (1999) Fluorometric method for the enzymatic determination of cholesterol. *J. Biochem. Biophys. Method*, 38: 43-52.
- Assmann, G., Cullen, P., Jossa, F., Lewis, B., Mancini, M. (1999) Coronary heart disease: Reducing the risk - The scientific background to primary and secondary prevention of coronary heart disease a worldwide view. *Arterioscler. Tromb. Vasc. Biol.*, 19: 1819-1824
- Bassi, A.S., McGrath, C. (1999) Carbon paste biosensor based on crude soybean seed hull extracts for phenol detection. *J. Agric. Food Chem.*, 47: 322-326
- Botsoglou, N., Fletouris, D., Psomas, I., Mantis, A. (1998) Rapid gas chromatographic method for simultaneous determination of cholesterol and alpha-tocopherol in eggs. *J. AOAC Internat.*, 81: 1177-1183
- Brahim, S., Narinesingh, D., Guiseppi-Elie, A. (2001) Amperometric determination of cholesterol in serum using a biosensor of cholesterol oxidase contained within a polypyrrole-hydrogel membrane. *Anal. Chim. Acta*, 448: 27-36
- Campanella, L., Cordatore, M., Mazzei, F., Tomassetti, M. (1990) Determination of inorganic phosphate in drug formulations and biological fluids using a plant tissue electrode. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 8: 711-716
- Cosnier, S. (1999) Biomolecule immobilization on electrode surfaces by entrapment or attachment to electrochemically polymerized films. A review. *Biosens. Bioelec.*, 14: 443-456
- Cummings, E.A., Mailley, P., Linquettemailley, S., Eggins, B.R., Mcadams, E.T., Mcfadden, S. (1998) Amperometric carbon paste biosensor based on plant tissue for the determination of total flavanol content in beers. *Analyst* 123: 1975-1980
- Emara, S., Hussien, S.A., Mohamed, F.A. (1999) Determination of cholesterol in egg yolk by high performance liquid chromatography using an automated precolumn-switching procedure. *J. Liq. Chromat. Rel. Technol.*, 22: 1235-1246
- Emr, S.A., Yacynych, A.M. (1995) Use of polymer film in amperometric biosensors. *Electroanalysis*, 7: 913-923
- Gaziano, J.M., Sesso, H.D., Breslow, J.L., Hennekens, C.H., Buring, J.E. (1999) Relation between systemic hypertension and blood lipids on the risk of myocardial infarction. *Am. J. Cardiol.*, 84: 768-773
- Hall, E.A.H. (1991) *Biosensor*. New Jersey: Prentice Hall. Englewood Cliffs
- Horie, H., Rechnitz, G.A. (1995) Hybrid tissue enzyme biosensor for pectin. *Anal. Chim. Acta*, 306: 123-127
- Karube, I., Nomura, Y. (2000) Enzyme sensors for environmental analysis. *J. Mol. Catal. B: Enzymatic*, 10: 879-990
- Konig, A., Bachmann, T.T., Metzger, J.W., Schmid, R.D. (1999) Disposable sensor for measuring the biochemical oxygen demand for nitrification and inhibition of nitrification in wastewater. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 51: 112-117
- Liang, J.F., Li, Y.T., Yang, V.C. (2000) Biomedical application of immobilized enzymes. *J. Pharm. Sci.*, 89: 177-181
- Lima, A.W.O., Nascimento, V.B., Pedrotti, J.J., Angnes, L. (1997) Coconut-based plant tissue reactor for biosensing of catechol in flow injection analysis. *Anal. Chim. Acta*, 354: 325-331
- Martin, S.P., Lamb, D.J., Lynch, J.M., Reddy, S.M. (2003) Enzyme-based determination of cholesterol using the quartz crystal acoustic wave sensor. *Anal. Chim. Acta*, 487(1): 91-100
- Oungpipat, W., Alexander, P.W., Southwellkeely, P. (1995) A reagentless amperometric biosensors for hydrogen peroxide determination based on asparagus tissue and ferrocene mediation. *Anal. Chim. Acta*, 309: 35-45
- Qin, W., Zhang, Z.J., Peng, Y.Y., Li, B.X. (1999) Plant tissue based chemiluminescence flow biosensor for oxalate. *Anal. Comm.*, 36: 337-339
- Singh, S., Chaubey, A., Malhotra, B.D. (2004), Amperometric cholesterol biosensor based on immobilized cholesterol esterase and cholesterol oxidase on conducting polypyrrole films. *Anal. Chim. Acta*, 502(2): 229-234
- Situmorang, M., Alexander, P.W., Hibbert, D.B. (1998) Flow injection potentiometry for enzymatic assay of cholesterol with a tungsten electrode sensor. *Talanta*, 49: 639-649
- Skoog, D.A., Leary, J.J. (1992) *Principles of Instrumental Analysis* (4th ed.). New York: Saunders College Publishers
- Sniderman, A.D., Cianflone, K. (1999) Lipids and vascular disease: what we do and do not know. *Clin. Chim. Acta*, 286: 7-22.
- Takemoto, D., Furuse, K., Doke, N., Kawakita, K. (1997) Identification of chitinase and osmotin-like protein as actin-binding proteins in suspension-cultured potato cells. *Plant Cell Physiol.*, 38: 441-448
- Vo-Dinh, T., Cullum, B. (2000) Biosensors and biochips: advances in biological and medical diagnostics. *Fresenius J. Anal. Chem.*, 366: 540-551
- Wijesuriya, D.C., Rechnitz, G.A. (1993) Biosensors based on plant and animal tissues. *Biosens. Bioelec.*, 8: 155-160
- Yao, T., Takashima, K. (1998) Amperometric biosensor with a composite membrane sol-gel derived enzyme film and electrochemical generated poly(1,2-diaminobenzene) film. *Biosens. Bioelec.*, 13: 67-73

JURNAL ISSN 0853-3792 Volume 30, Nomor 4
Oktober - Desember 2006

SAINS INDONESIA

Memuat Hasil Penelitian Sains dan Matematika, Teori dan Penerapannya

Daftar Isi

<i>Manihar Situmorang, Pasar M. Silitonga, Isnaini Nurwahyuni, Arikles Butarbutar & Marlina Nainggolan</i>	Rancang Bangun Biosensor Elektrokimia dalam Sistem Flow Injeksi Analisis untuk Penentuan Kolesterol dalam Makanan dan Minuman	125 - 130
<i>Syahmi Edi</i>	Pengujian Beberapa Genotipa Tanaman Padi Hasil Kultur <i>In Vitro</i> pada Tanah Masam	131 - 135
<i>Adriana Y.D. Lbn Gaol</i>	Pengaruh Aktivitas Fisik Berat dan Kronis terhadap Siklus Estrus Mencit (<i>Mus musculus</i>) Betina Strain DD Webster	136 - 142
<i>Panigoran Sihombing</i>	Gambaran Darah, Berat Badan, dan Pertumbuhan Jengger Ayam yang Diberi Ekstrak Bunga Kembang Sepatu (<i>Hibiscus rosasinensis</i>)	143 - 147
<i>Panal M. Siahaan</i>	Studi Tetramerosis pada Ayam Buras di Kotamadya Medan dan Sekitarnya	148 - 151
<i>Ani Minarni</i>	Ukuran Pemusatan dan Ukuran Dispersi Distribusi Rayleigh	152 - 156
<i>Asmin</i>	Penetapan Teori Responsi Butir dengan Persyaratan Analisis Instrumen Sebagai Prasyarat untuk Ketepatan Hasil Analisis dalam Penelitian	157 - 163
<i>Argem</i>	Studi Kualitas Perairan Bedagai Tanjung Beringin Ditinjau dari Komunitas dan Klorofil Fitoplankton	164 - 167

DEVELOPMENT OF URIC ACID BIOSENSOR FOR THE DETERMINATION OF URIC ACID IN VARIOUS TYPES OF FOOD SAMPLES

Manihar Situmorang^{#*}, Pasar Maulim Silitonga*, Isnaini Nurwahyuni^{}, Toni Hitler Siregar*, Rumondang Simatupang*, and Herlina Krisnawati***

**Department of Chemistry, Faculty of Mathematics and Natural Science, State University of Medan, Medan, North Sumatera, 20221, INDONESIA.*

***Department of Biology, Faculty of Mathematics and Natural Science, University of North Sumatera, Medan, North Sumatera, 20155, INDONESIA*

Abstract

The development of uric acid biosensor for the determination of uric acid in food samples is described. The biosensor was based on immobilization of uric oxidase (UOx) in electrodeposited polytyramine. Electropolymerization and immobilisation of enzyme onto platinised glassy carbon electrode (GC/Pt) were performed in an aqueous solution of 0.1M tyramine containing UOx followed by covalent attachment using EDC/NHS crosslinking agents. The uric acid biosensor constructed at 5 sweep cycles showed a sensitive response to uric acid with a linear calibration curve lies in the concentration range of 0.1 – 2.5 mM, slope 0.066 $\mu\text{A}/\text{mM}$, and the limit detection was 0.05 mM uric acid (S/N=3). Deposited polytyramine enhance the selectivity of the biosensor. The biosensor showed sensitive response to uric acid. Analytical procedure for uric acid is simple where the determination was performed without sample pretreatment except the dilution of the sample in 4% of Li_2CO_3 . The biosensor has been applied for the determination of uric acid in various types of food samples, and the results obtained are in agree with that using enzymatic spectrophotometric method.

Keywords: biosensor, electrodeposited, polytyramine, enzyme immobilisation, uric acid, food samples

[#]Corresponding author

Introduction

The role of uric acid in food has to be aware since it was known that uric acid at a certain level is associated with cardiovascular and cerebrovascular disease. Uric acid (UA) is known as the final product of purine degradation has been shown to be increased in hypoxic states

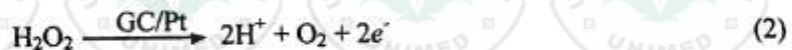
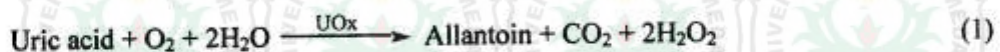
such as chronic heart failure, cyanotic congenital heart disease [], and obstructive pulmonary disease []. Serum UA levels have recently been shown to have association with chronic heart failure []. Several epidemiological reports showed a significant relationship between SUA and cardiovascular and cerebrovascular disease. In patients with hypertension, SUA was defined as an independent risk factor for cardiovascular disease. In the National Health and Nutrition Survey (NHANES I study), SUA was an independent risk factor for cardiovascular disease in both men and women []. There are several cohort study reports in Japan on the relationship between SUA and the risk factors for diseases such like cardiovascular diseases, other cardiogenic diseases, cerebrovascular disease, renal failure, hepatogenic diseases, cancer, and mortality. In a cohort study of industrial workers, Tomita et al reported that hyperuricemia raises the incidence of these diseases and mortality [], and Hakoda et al reported that SUA is an independent risk factor for cardiovascular disease in women, and for total mortality in both men and women []. On the basis of such evidence, SUA is suggested to be a significant risk marker in the Japanese criteria. Some concluded that SUA is an independent risk factor for cardiovascular disease (CVD),²⁻⁶ with an apparently stronger association in women than in men [] in the elderly [] and in patients with essential hypertension, [] congestive heart failure [] and diabetes mellitus []. In contrast, the Framingham Heart Study concluded that an association with CVD merely reflects the link between SUA and other risk factors, including hypertension, renal disease, elevated lipoprotein levels and the use of diuretics. Elevated serum uric acid (UA) has recently been analyzed in patients with chronic heart disease, [] cyanotic congenital heart disease [] and chronic obstructive lung disease []. Several studies have showed a close relationship between hyperuricemia and heart failure or other cardiovascular diseases []. Moreover, the serum uric acid concentration is closely correlated with the severity of symptoms and mortality in patients with idiopathic PAH [] or Eisenmenger syndrome []. However, the association between serum UA levels and long-term outcome in PAH secondary to connective tissue disease has not been evaluated.

The determination of serum uric acid is important in food samples, because atypical total uric acid in serum is an indicator of abnormality in purin metabolism, of arteriosclerosis and hypertension. Epidemiological and clinical studies have demonstrated a strong positive

correlation between the total uric acid in human blood serum and the incident of coronary heart diseases [1]. As awareness of the importance of uric acid levels has increased, various analytical methods have been used for uric acid assays in food, including colorimetric [2] spectrometric [3] and electrochemical methods [4], where enzymatic procedures are mainly employed, due to their rapid, selective, sensitive nature and the great accuracy obtained in the measurements.

The development of biosensor is very interesting to obtain a fast, selective, sensitive, reliable and accurate method for uric acid determination. Electrochemical detection systems on the biosensor for uric acid assay are frequently based on the monitoring the consumption of oxygen or the rate production of hydrogen peroxide [5] by an enzymatic reaction. However, the presence of electroactive compounds in the matrix samples interferes the electrochemical method that would effect the accuracy of the measurement. Attempts have been made to enhance the selectivity of uric acid biosensor by coating the electrode surface with membrane film using various types of electrodeposited polymer [6]. The construction of the biosensor using electrodeposited polymer is promising in the simplicity of the fabrication of the sensor, however, the stability of the enzyme in the matrix polymer such as polypyrrole [7] was very low. Non conducting polytyramine is an ideal polymer for the fabrication of enzyme layers as it can be both electropolymerised into an electrode surface [8] and the biorecognition molecule can be attached into free amino group of the polymer via the formation of a peptide linkage [9]. Polytyramine film has been demonstrated as a suitable matrix polymer for the construction of stable and reproducible biosensor, and it potentially be used to eliminate the effect of interference from electroactive compounds present in real sample [10].

The proposed system is based upon a successful for electrochemical biosensors described in previous studies [11]. Determination of uric acid by this system is based on enzymatic catalytic reaction:



Uric acid is enzymatically oxidised to produce allantoin and hydrogen peroxide in the presence of immobilised uric oxidase (UOx) in the polytyramine film. The hydrogen peroxide released is then monitored amperometrically via its oxidation at a constant potential of 0.65V vs Ag/AgCl on the modified enzyme electrode GC/Pt/PTy/UOx. The measuring current obtained from the biosensor (as shown from equation 1-2) is stoichiometrically equivalent to the concentration of the uric acid in the sample.

The purpose of this paper is to present our results on the development of a sensitive and selective biosensor for determination of uric acid. The technique explains a simple method for constructing the enzyme electrode through electrodeposition of the polytyramine film in the presence of UOx into the surface of platinised glassy carbon electrode followed by coupling reaction between the polymer and the enzyme. The performance of the uric acid biosensor is assessed based on its rapid response, sensitivity, reproducibility, stability, selectivity and its applications to determine uric acid in various types of food samples.

Experimental

Reagents

Uric acid oxidase (UOx) 50 unit/mg (E.C 1.7.3.3), peroxidase (POD) 179 units/mg (E.C.1.11.1.7.2) from horse radish, tyramine (4-hydroxyphenethylamine), N-hydroxysuccinimide (NHS), 1-ethyl-3(3 dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride (EDC), cysteine, trizma-HCl, glucose, fructose, and glutamine were obtained from Sigma Chem. Co. St. Louis, MO, USA. Potassium hexachloroplatinate(IV) was obtained from Aldrich Chem. Co. St. Louis, MO, USA. Reagent grades of Na_2SO_3 , K_2HPO_4 , KH_2PO_4 , KCl, $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$, HCl, CH_3COONa , Li_2CO_3 , ascorbic acid, methanol, and ethanol were purchased from Aldrich. Food samples (various types of meat, fish, vegetables, and beans) were collected randomly from local supermarket. All reagents were used without purification and deionised water was used for all solutions.

Uric acid standard solution was prepared by dissolving uric acid in 4% lithium carbonate (Li_2CO_3). Buffer solution of 0.05 M phosphate buffer containing of 0.05 M KCl supporting

electrolyte was prepared from KH_2PO_4 and the pH (pH 5.5-7.0) was adjusted with K_2HPO_4 solution. The same procedures were conducted to prepare acetate buffer (pH 4.0-5.0) from the mixture of CH_3COONa with CH_3COOH , and trisma buffer (pH 7.5-8.0) from trizma-base adjusted with trizma-HCl, the concentration of each buffer solution was 0.05 M containing of 0.05 M KCl. The solution containing 0.015 M EDC and 0.03 M NHS was prepared in phosphate buffer (0.05 M, pH 5.5) and were freshly prepared prior to coupling reaction between the enzyme and polytyramine.

Instrumentation

Amperometric measurements, electropolymerisation and cyclic voltammetry were performed in a three electrode cell using a BAS 100B (Bioanalytical System Inc. Lafayette) potentiostat. A glassy carbon disk electrode (BAS), area of 0.070 cm^2 was used as working electrode, the reference Ag/AgCl electrode was from BAS and a home-made platinum wire electrode (1 cm, 0.5 mm diameter) was used as the auxiliary electrode.

Preparation of Enzyme Electrode

Preparation of enzyme electrode was conducted followed the procedures explain in the previous paper [] with modification based on the different types of enzyme used. In brief, electrodeposition of platinum on a glassy carbon (GC) electrode was conducted at a constant potential of -0.3V versus Ag/AgCl in a solution of 2 mM K_2PtCl_6 in 1% HCl for 10 minutes. Electropolymerization and immobilisation of enzyme into platinised glassy carbon (GC/Pt) were performed in an aqueous solution of 0.1 M tyramine dissolved in methanol-phosphate buffer (1:3) containing of 20 unit ml^{-1} UOx by cycling the potential between -0.1 V and $+1.7 \text{ V}$ vs Ag/AgCl at 0.5 V s^{-1} for 5 cycles. Covalent attachment of the enzyme to the amine groups on the polymer was accomplished by coupling with 0.015 M EDC and 0.03 M NHS, pH 5.5, for one hour at room temperature to form modified enzyme electrode (GC/Pt/PTy/SOD). The enzyme electrode was then rinsed with phosphate buffer solution under a constant stirring to remove loosely bounded enzyme and to clean the electrode surface from excess of adsorbed EDC and NHS. The enzyme electrode was then stored dry overnight

at 4 °C, and was conditioned for 5 minutes in phosphate buffer solution (pH 6.0) before use. To keep the activity of the enzyme remains constant for a longer time of uses, the electrode is stored dry in the fridge (4 °C) when not in use.

Sample preparation

Preparation of food samples for uric acid assay was conducted as follow. The food sample was firstly cut and grinded followed by heated in oven (60 °C) for 24 hours to make sure samples are dry. Dry sample of 1 mg food samples was dissolved in 1 ml of 4% Li₂CO₃ solution, heating in water bath (60 oC) for 10 minutes followed by centrifugation, and aliquote are then ready to be analyzed.

Uric acid Measurement

Amperometric determination of uric acid was performed by applying a constant potential of 0.5 V vs Ag/AgCl. The background current was allowed to settle to a constant baseline, and a series of uric acid standard solutions (from a stock solution of 0.1 M uric acid) was added into 10 ml (0.05 M, pH 6.0) phosphate buffer solution, with stirring for five seconds after the addition. The enzymatic reaction was monitored continuously until steady state values were reached via the oxidation of the hydrogen peroxide produced at the electrode surface. Determination of uric acid in food samples was conducted without pretreatment except by dilution of the samples in 4% Li₂CO₃ solution. The food samples (100 µl) were injected into 2.5 ml phosphate buffer solution containing of 4% Li₂CO₃ (0.05M, pH 6.0) and the steady current responses were measured. The hydrogen peroxide produced by the reaction of the oxidase enzyme was oxidized at the electrode by applying a constant potential of 0.65 V vs Ag|AgCl. The current produced is related to the concentration of the uric acid in the sample. Prior to addition of analyte, the background current was allowed to settle to a constant baseline in phosphate buffer solution (0.05 M, pH 6.0). Additions of analyte were then made from a stock solution of the analyte dissolved in phosphate buffer solution (0.05 M, pH 6.0). After each addition the solution was stirred for five seconds. The current was monitored

continuously and further additions were made once the oxidation current reached a steady signal. Determination of uric acid in food sample was also conducted by using standard procedure spectrophotometric method with modification. Samples are reacted with enzyme uricase, followed by addition of *o*-dianisidine (5 mM) catalysed by peroxidase, and analyzed at $\lambda 550$.

Interference studies

To evaluate the capability of polytyramine membrane film to reject the response from interfering agents, the response currents of a polytyramine-UOx electrode were measured in solutions containing separately 1 mM uric acid, ascorbic acid, glucosa, fructosa, cholesterol, amino acid, and some cations.

Results and Discussion

Electrodeposition and characterization of polytyramine film

Electropolymerization of polytyramine conducted from aqueous tyramine solution containing enzyme produced thin and transparent membrane film that was strongly attached into the electrode surface. The voltammogram of the cyclic voltammetry (cv) for the electrodeposition of polytyramine from tyramine solution contains UOx is presented in figure 1. As the number of cycles was increased the poor conductivity of the polytyramine films resulted in passivation of the electrode and hence a decrease in electrodeposition current. After several cycles, the electrode was sufficiently blocked such that only very low oxidation currents were observed. As with the electropolymerization of other phenols, linking occurs through the *ortho* position of the phenol group leaving the amine available for covalent attachment of the enzyme. The amount of polytyramine deposited at each voltammetric cycle was calculated from the charge passed during electropolymerization (Table 1).

1.2 Enzyme Response Curves

The response of a polytyramine electrode in which uricase is immobilized throughout the membrane is shown in Fig. 2. Steady state currents for the oxidation of hydrogen peroxide (produced from enzymatic reaction with uric acid) were obtained within two minutes of the addition of uric acid. As Fig. 3 demonstrates the enzyme electrode has a linear range between 0.1-15 mM uric acid (slope $0.245 \mu\text{A mM}^{-1}$), and the detection limit of the electrode was 0.03 mM glucose ($S/N=3$). A wide linear range and low detection limit is necessary for a biosensor to be used to analyze various types of natural samples, such as food samples without pretreatment.

Of particular interest in Fig. 3 is the reproducibility of the enzyme electrodes fabricated with polytyramine. The response curve in the figure is the average of 5 electrodes made in the same way but on different days with different batches of reagents. The variation between response curves for uric lies between 0.8% at a low concentrations and up to 5.2% at the saturation concentration. Although there is little information in the literature on the reproducibility that has been achieved with other methods of fabricating enzyme electrodes the reproducibility achieved with the polytyramine electrodes appears to be excellent. Hall *et al* [] have concluded that precision to which the thickness of the enzyme layer can be cast onto electrodes, using methods such as dip-coating, ink-jet printing and screen printing, is commonly insufficient to avoid significant variation in response between sensors. We attribute this reproducibility to the thickness of the enzyme layer being limited by the resistance of the film, and to the immobilization procedure.

The Effect of Membrane Layer

The effect of the thickness of the membrane layer into the response sensitivity of enzyme electrode was assessed through its response to uric acid. The enzyme electrode was constructed through electrodeposition of polytyramine for 1 to 10 cycles, and the response

sensitivity of the membrane layer was determined from the calibration curve of uric acid (figure 4). The performance of the enzyme electrodes constructed at various sweep cycles were compared based on their slope as summarised in table 1. The results shown that the response sensitivity of enzyme electrode was effected by the relative amount of deposited polytyramine in the membrane layer. The slope of the enzyme electrode decreased as the number of sweep cycle for growing the polytyramine film increased. The most sensitive response was obtained at a very thin film, that was for membrane film grown at one cycle. However, since uric acid is known to be oxidised on platinised electrode, it is necessary to use a thicker polytyramine membrane film to prevent direct oxidation of uric acid and other electroactive compounds in the electrode surface.

To demonstrate the ability of polytyramine film to prevent direct oxidations of uric acid on the electrode surface as well as to assess its potential uses as an enzyme immobilisation matrix polymer, the response of the modified electrode GC/Pt/PTy and GC/Pt/PTy/UOx for 0.1 mM uric acid were measured at different membrane films (figure 5). The data in figure 5 were taken from the response of modified electrodes (GC/Pt/PTy/UOx) at various thiknes of polytyramine in the electrode surface. A lower current response observed at the thicker membrane film might be results from the ability of nonconducting polytyramine to exclude the uric acid. In contrast, by injecting the same concentration of uric acid in the buffer solution, the current response from GC/Pt/PTy/UOx increased when the enzyme electrode coated one cycle, due to the detection of hydrogen peroxide produced on enzymatic oxidation of the uric acid. Examine further on GC/Pt/PTy/UOx constructed at higher sweep cycles shown decrease in current sensitivity for 0.1 mM uric acid successively to 89%, 72%, 60%, and 38% at the enzyme electrode grown at 3, 5, 7 and 10 sweep cycles. Choosing a thicker membrane film without loosing much on response sensitivity has to be considered for the construction of uric acid biosensor. Therefore, electrodeposition of polytyramine at five cycles was chosen in the

experiment since it reduced the response from direct oxidation of uric acid, and has a compromise in the sensitivity and stability of uric acid sensor [].

Reproducibility

The use of polytyramine as a matrix polymer for enzyme immobilization has been demonstrated to produce a reproducible biosensor []. The reproducibility of the uric acid biosensor constructed in the same matrix polytyramine has been studied. Enzyme electrode has been made at different days on the same procedures with different batches of reagents, and the response curve is presented in the figure 6, that is the average of 5 electrodes. The variation between response curves for uric acid lies between RSD 0.7% at low concentrations and up to RSD 13% at the saturation concentration. The reproducibility of enzyme electrode is very good. The results obtained for uric acid biosensor was almost similar to enzyme electrode for glucose reported in our previous study [].

Stability of the Enzyme Biosensor

Stability of the biosensor is one of the major hindrances to the commercialisation of the biosensor. The stability of uric acid biosensor has been investigated under the dry storage condition in the fridge (4 °C) for up to 3 months by using the same electrode. The enzyme electrodes showed negligible loss of sensitivity after 1 month of storage, compared with a 1 day old device (figure 6). Decrease in response sensitivity about 5% compare to the sensitivity of a fresh enzyme electrode was observed after storing the electrode 2 months in the fridge, and it continues to decrease 15% after about 3 months storage. The activity of enzyme electrode was remain constant when the electrode was used repeatedly for 40 measurements for about ten hours. The stability of enzyme in electrodeposited polytyramine matrix polymer is much better compare to other existing polypyrrole [] which only stable for about 4 hours for repeated uses.

Performance of Uric acid Biosensor

The response of enzyme electrode as a function of concentration of uric acid is presented in figure 7. The current response for the injection of uric acid increased linearly in proportional to the concentration of uric acid (figure 3). The current signal to the change in uric acid concentration is based on the formation of hydrogen peroxide results from enzymatic catalytic oxidation of uric acid. The signal increased sharply 30 second after the injection of uric acid sample, followed by a decrease in current peak until a steady state current for the oxidation of hydrogen peroxide were obtained within less than two minutes of the addition of uric acid. Calibration curves for uric acid standard solutions were constructed under optimum conditions, shows a linear range concentration from 0.05-0.3 mM uric acid, with a calibration slope of $2.70 \mu\text{A mM}^{-1}$. The detection limit is 0.001 mM uric acid ($S/N=3$). A very low detection limit accompanied by wide linear range is necessary for a biosensor to be used to analyse food sample samples without pretreatment.

Selectivity of Uric acid Biosensor

The uric acid biosensor is intended to be used to analyse uric acid in food sample. Several concentrations of possible interfering agents that might be presents in food sample were added into uric acid standard solution, those including ascorbic acid, glucosa, fructosa, cholesterol, amino acid, and some cations. The presence of 1 mM of the listed interfering agents in 0.1 mM uric acid did not change the current sensitivity, except for a high concentration of ascorbic acid ($>2 \text{ mM}$). However, the concentration of 2 mM ascorbic acid is above the average levels of addition range 0.3-1.2 mM ascorbic acid in foodmaking industry []. The presence of ethanol below 10% (v/v) in the sample also did not effect the signal current. The concentration of ethanol in food sample are lies in the range concentration of 10-20% ethanol []. A high concentration of ethanol and other interfering agents in food sample do not effect the biosensor for the dilution of the sample with buffer solution will bring the

concentration of interfering species down to very low level. The biosensor using polytyramine matrix polymer is very selective for uric acid, for the polytyramine membrane film excluded the electroactive species and the proteins that commonly found in food samples.

Determination of uric acid in food sample

Uric acid biosensor has been applied for the determination of uric acid in food samples. Various types food samples were analysed for uric acid using the biosensor and the standard spectrophotometric methods. Since the uric acid dissolved in Li_2CO_3 solution, therefore, buffering the solution and the addition of 4% Li_2CO_3 is necessary for the analysis with biosensor, in which the solutions were maintained at the range pH 5.91-5.97 after the injection of food sample into phosphate buffer pH 6.0. The results of the average values from three measurements and the recovery of the biosensor are summarised in table 2. The amount of uric acid in food samples determined by the uric acid biosensor showed a high degree of correlation ($r = 0.97$) with the standard spectrophotometric method (Figure 7). The amount of uric acid in food sample analysed by the biosensor was higher than that analysed by the spectrophotometric method.

The accuracy of the method was demonstrated by comparing the measured concentration with assigned values of uric acid in reference control solutions dan uric acid standard solutions. The concentrations of uric acid in the reference control solutions and uric acid standard solutions analyzed by this present method were mostly within the range of the assigned values (table 3). The results obtained with the electrochemical biosensor method for food samples also agree well with those obtained by the standard spectrophotometric method.

This present method has been applied for the determination of uric acid in food samples. Various type of food samples such as vegetables, beans, canned meat, fresh meats, and fresh fish were analysed independently by two methods: the present biosensor method and the standard spectrophotometric method. The concentration of uric acid in food samples was

determined independently on the day of collection, and the mean values of uric acid measurements are summarised in table 3. A plot of the results obtained by electrochemical biosensor against those from the spectrophotometric method, gave a correlation coefficient of 0.935 (figure 7). This result reveals a close agreement between the present method and the standard spectrophotometric method, and confirms that the biosensor method meets the rigid demands expected for uric acid in food samples.

Conclusion

Polytyramine film has been demonstrated as a very good matrix polymer for enzyme immobilization for the construction of uric acid biosensor. The biosensor constructed using polytyramine produced a sensitive, selective, stable, and reproducible biosensor. The electrodeposited polytyramine has an ability to prevent direct oxidation of uric acid and other interfering agents in the electrode surface. The application of uric acid biosensor for the determination of uric acid in food samples gives reliable results, in which the concentration of uric acid in food samples determined by the uric acid biosensor showed a high degree of correlation with the standard spectrophotometric method.

Acknowledgement

The research grand from Proyek Hibah Bersaing Perguruan Tinggi Dirjen Dikti Depdiknas (DGHE) for funding aspects of this work is gratefully acknowledged.

References

- Akyilmaz, E.; Sezgin Turk, M.K. dan Dinckaya, E., (2003), A biosensor based on urate oxidase-peroxidase coupled enzyme system for uric acid determination in urine, *Talanta* **61**(2): 73 – 79
- Albert, K.J.; Lewis, N.S.; Schauer, C.L.; Sotzing, G.A.; Stitzel, S.E.; Vaid, T.P. and Walt. D.R., (2000), Cross-reactive chemical sensor arrays, *Chemical Reviews* **100**: 2595-2626.
- Alper, A.B. Jr., Chen, W., Yau, L., Srinivasan, S.R., Berenson, G.S., dan Hamm, L.L., (2005), Childhood uric acid predicts adult blood pressure: the Bogalusa Heart Study., *Hypertension*. **45**(1): 34-38.
- Bassi, A.S. dan McGrath, C. (1999), Carbon paste biosensor based on crude soybean seed hull extracts for phenol detection, *Journal of Agricultural & Food Chemistry* **47**: 322-326.

- Bruun, S.W., Søndergaard, I., dan Jacobsen S, (2007), Analysis of protein structures and interactions in complex food by near-infrared spectroscopy. 1. Gluten powder, *J Agric Food Chem.* **55(18)**: 7234-43
- Buldini, P.L.; Ricci, L. dan Sharma, J.L., (2002), Recent applications of sample preparation techniques in food analysis, *Journal Of Chromatography A* **975(1)**: 47-70.
- Campanella, L.; Cordatore, M.; Mazzei, F. dan Tomassetti, M., (1990), Determination of inorganic phosphate in drug formulations and biological fluids using a plant tissue electrode, *Journal of Pharmaceutical & Biomedical Analysis* **8**: 711-716.
- Capar, S.G., Mindak, W.R., dan Cheng, J., (2007), Analysis of food for toxic elements, *Anal Bioanal Chem* **389(1)**: 159-169
- Castillo-Ortega, M.M.; Rodriguez, D.E.; Encinas, J.C.; Plascencia, M.; Méndez-Velarde, F.A. dan Olayo, R. (2002), Conductometric uric acid and urea biosensor prepared from electroconductive polyaniline-poly(*n*-butyl methacrylate) composites, *Sensors And Actuators B: Chemical* **85(1-2)**: 19-25.
- Centronic, G, (2003), Enzymatic Colorimetric Assay For Determination of Uric Acid in Serum or Urine, www.Centronic-GmbH.com/pdf/holyo.pdf
- Cherubini, A.; Polidori, M.C.; Bregnocchi, M.; Pezzuto, S.; Cecchetti, R.; Ingegni, T.; di Iorio, A.; Senin, U. dan Mecocci, P., (2000), Antioxidant profile and early outcome in stroke patients, *Stroke (Online)* **31**: 2295-2300.
- Cosnier, S., (1999), Biomolecule immobilization on electrode surfaces by entrapment or attachment to electrochemically polymerized films. A review, *Biosensors & Bioelectronics* **14**: 443-456.
- Cummings, E.A.; Mailley, P.; Linquettemailley, S.; Eggins, B.R.; Mcadams, E.T. dan Mcfadden, S., (1998), Amperometric carbon paste biosensor based on plant tissue for the determination of total flavanol content in beers, *Analyst* **123**: 1975-1980.
- Czauderna, M. dan Kowalczyk, J., (2000), Quantification of allantoin, uric acid, xanthine and hypoxanthine in ovine urine by high-performance liquid chromatography and photodiode array detection, *Journal of Chromatography. B, Biomedical Sciences & Applications* **744**: 129-138.
- D'Anna, R.; Baviera, G.; Scilipoti, A.; Leonardi, I. dan Leo, R., (2000), The clinical utility of serum uric acid measurements in pre-eclampsia and transient hypertension in pregnancy, *Panminerva Medica* **42**: 101-103.
- Emr, SA. and Yacynych, A.M. (1995), Use of polymer film in amperometric biosensors, *Electroanalysis* **7**: 913-923.
- Galbán, J.; Andreu, Y.; Almenara, M.J.; de Marcos, S. dan Castillo, J.R., (2001), Direct determination of uric acid in serum by a fluorometric-enzymatic method based on uricase, *Talanta* **54(5)**: 847-854.
- Hall, E.A.H., (1991), *Biosensor*, Prentice Hall. Englewood Cliffs, New Jersey.
- Hasebe, Y.; Nawa, K.; Ujita, S. dan Uchiyama, S., (1998), Highly sensitive flow detection of uric acid based on an intermediate regeneration of uricase, *Analyst* **123**: 1775-1780.
- Hong, H.C. dan Huang, H.J., (2003), Flow injection analysis of uric acid with a uricase-and horseradish peroxidase-coupled Sepharose column based luminol chemiluminescence system, *Analytica Chimica Acta* **499(1-2)**: 41-46.
- Horie, H. dan Rechnitz, G.A., (1995), Hybrid tissue enzyme biosensor for pectin, *Analytica Chimica Acta* **306**: 123-127.
- Inoue, K.; Namiki, T.; Iwasaki, Y.; Yoshimura, Y. dan Nakazawa, H., (2003), Determination of uric acid in human saliva by high-performance liquid chromatography with amperometric electrochemical detection, *Journal Of Chromatography B, Analytical Technologies In The Biomedical And Life Sciences* **785(1)**: 57-63.

- Ishizaka, N., Ishizaka, Y., Toda, E., Hashimoto, H., Nagai, R., dan Yamakado, M., (2007), Higher serum uric acid is associated with increased arterial stiffness in Japanese individuals., *Atherosclerosis* **192**(1): 131-137
- Jen, J.F.; Hsiao, S.L. Dan Liu, K.H., (2002), Simultaneous determination of uric acid and creatinine in urine by an eco-friendly solvent-free high performance liquid chromatographic method, *Talanta* **58**(4): 711-717.
- Kahn, K. dan Tipton, P.A., (1998), Spectroscopic characterization of intermediates in the urate oxidase reaction, *Biochemistry* **37**: 11651-11659.
- Kang, D.H., dan Nakagawa, T., (2005), Uric acid and chronic renal disease: possible implication of hyperuricemia on progression of renal disease., *Semin Nephrol.* **25**(1): 43-49.
- Kang, D.H., Nakagawa, T., Feng, L., Watanabe, S., Han, L., Mazzali, M., Truong, L., Harris, R., dan Johnson, R.J., (2002), A role for uric acid in the progression of renal disease., *J Am Soc Nephrol.* **13**(12): 2888-2897.
- Karube, I. dan Nomura, Y., (2000), Enzyme sensors for environmental analysis, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **10**: 879-990.
- Konig, A.; Bachmann, T.T.; Metzger, J.W. dan Schmid, R.D., (1999), Disposable sensor for measuring the biochemical oxygen demand for nitrification and inhibition of nitrification in wastewater, *Applied Microbiology & Biotechnology* **51**: 112-117.
- Krisnatuti, Diah, (2001), *Perancangan Menu Untuk Penderita Gangguan Asam Urat*, cetakan kelima, Penebar Swadaya, Jakarta
- Liang, J.F.; Li, Y.T. dan Yang, V.C., (2000), Biomedical application of immobilized enzymes, *Journal of Pharmaceutical Sciences* **89**: 177-181.
- Liese, A.D.; Hense, H.W.; Lowel, H.; Doring, A.; Tietze, M. dan Keil, U., (1999), Association of serum uric acid with all-cause and cardiovascular disease mortality and incident myocardial infarction in the MONICA Augsburg cohort. World Health Organization Monitoring Trends and Determinants in Cardiovascular Diseases, *Epidemiology* **10**: 391-397.
- Lima, A.W.O.; Nascimento, V.B.; Pedrotti, J.J. dan Angnes, L., (1997), Coconut-based plant tissue reactor for biosensing of catechol in flow injection analysis, *Analytica Chimica Acta* **354** 325-331.
- Maesaka, J.K. dan Fishbane, S., (1998), Regulation of renal urate excretion: a critical review, *American Journal of Kidney Diseases* **32**: 917-933.
- Marklund, N.; Ostman, B.; Nalmo, L.; Persson, L. dan Hillered, L., (2000), Hypoxanthine, uric acid and allantoin as indicators of in vivo free radical reactions. Description of a HPLC method and human brain microdialysis data, *Acta Neurochirurgica* **142**:1135-1141.
- Miertuš, S.; Katrlík, J.; Pizzariello, A.; Stred'anský, M.; Švitel, J. dan Švorc, J., (1998), Amperometric biosensors based on solid binding matrices applied in food quality monitoring, *Biosensors And Bioelectronics* **13**(7-8): 911-923.
- Nagahama, K., Inoue, T., Iseki, K., Touma, T., Kinjo, K., Ohya, Y., dan Takishita, S., (2004), Hyperuricemia as a predictor of hypertension in a screened cohort in Okinawa, Japan., *Hypertens Res.* **27**(11): 835-841
- Niizeki, T., Takeishi, Y., Arimoto, T., Okuyama, H., Nozaki, N., Hirono, O., Tsunoda, Y., Watanabe, T., Nitobe, J., Miyashita, T., Takahashi, H., Koyama, Y., dan Kubota, I., (2006), Hyperuricemia associated with high cardiac event rates in the elderly with chronic heart failure., *J Cardiol.* **47**(5): 219-228
- Oungpipat, W.; Alexander, P.W. dan Southwellkeely, P., (1995), A reagentless amperometric biosensors for hydrogen peroxide determination based on asparagus tissue and ferrocene mediation, *Analytica Chimica Acta* **309**: 35-45.

- Peris, M., (2002), Present and future of expert systems in food analysis, *Analytica Chimica Acta* **454(1)**: 1-11.
- Perlstein, T.S., Gumieniak, O., Hopkins, P.N., Murphey, L.J., Brown, N.J., Williams, G.H., Hollenberg, N.K., dan Fisher, N.D., (2004), Uric acid and the state of the intrarenal renin-angiotensin system in humans., *Kidney Int.* **66(4)**: 1465-1470.
- Perlstein, T.S., Gumieniak, O., Williams, G.H., Sparrow, D., Vokonas, P.S., Gaziano, M., Weiss, S.T., dan Litonjua, A.A., (2006), Uric acid and the development of hypertension: the normative aging study., *Hypertension* **48(6)**: 1031-1036
- Prakash, S. dan Chang, T.M., (2000), In vitro and in vivo uric acid lowering by artificial cells containing microencapsulated genetically engineered *E. coli* DH5 cells, *International Journal of Artificial Organs* **23**: 429-435.
- Pravdova, V.; Boucon, C.; de Jong, S.; Walczak, B. dan Massart, D.L., (2002), Three-way principal component analysis applied to food analysis: an example, *Analytica Chimica Acta* **462(2)**: 133-148.
- Qin, W.; Zhang, Z.J.; Peng, Y.Y. dan Li, B.X., (1999), Plant tissue based cheluminescence flow biosensor for oxalate, *Analytical Communication* **36**: 337-339.
- Situmorang, M. dan Gooding, J.J., (2000), New biosensors for wine analysis, *ChemoSense* **2(4)**: 1-3.
- Situmorang, M.; Gooding, J.J. dan Hibbert, D.B., (1999), Immobilisation of enzyme throughout a polityramine matrix: a versatile procedure for fabricating biosensors, *Analytica Chimica Acta* **394**: 211-223.
- Situmorang, M.; Gooding, J.J.; Hibbert, D.B. and Barnett, D., (1998), Electrodeposited polityramin as an immobilisation matrix for enzyme biosensors, *Biosensors & Bioelectronics* **13(9)**: 953-962.
- Situmorang, M.; Gooding, J.J.; Hibbert, D.B. dan Barnett, D., (2001), Development of potentiometric biosensors using electrodeposited polityramine as the enzyme immobilisation matrix, *Electroanalysis* **13**: 1469-1474.
- Situmorang, M.; Hibbert, D.B.; Gooding, J.J. dan Barnett, D., (1999), A sulfite biosensor fabricated using electrodeposited polityramine: application to wine analysis, *Analyst* **124**: 1775-1779.
- Skoog, D. A. and Leary, J. J., (1992), *Principles of Instrumental Analysis*, 4th ed., Saunders College Publishers, New York.
- Steven, S.J. dan Lehotay, J., (2002), Application of gas chromatography in food analysis, *Trends in Analytical Chemistry* **21(9-10)**: 686-697.
- Takemoto, D.; Furuse, K.; Doke, N. dan Kawakita, K., (1997), Identification of chitinase and osmotin-like protein as actin-binding proteins in suspension-cultured potato cells, *Plant & Cell Physiology* **38**: 441-448.
- Utami, P., (2003), *Tanaman Obat untuk Mengatasi Rematik dan Asam Urat*, Agromedia, Jakarta
- Uzun, K.; Vural, H.; Ozer, F. dan Imecik, O., (2000), Diagnostic value of uric acid to differentiate transudates and exudates, *Clinical Chemistry & Laboratory Medicine* **38**: 661-665.
- Vo-Dinh, T. dan Cullum, B., (2000), Biosensors and biochips: advances in biological and medical diagnostics, *Fresenius Journal of Analytical Chemistry* **366**: 540-551.
- Wijesuriya, D.C. dan Rechnitz, G.A., (1993), Biosensors based on plant and animal tissues, *Biosensors & Bioelectronics* **8**: 155-160.
- Yamamoto, Y., Matsubara, K., Igawa, G., Kaetsu, Y., Sugihara, S., Matsuura, T., Ando, F., Sonoyama, K., Hamada, T., Ogino, K., Igawa, O., Shigemasa, C., dan Hisatome, I., (2007), Status of uric acid management in hypertensive subjects, *Hypertens Res.* **30(6)**: 549-554

Yao, T dan Takashima, K., (1998), Amperometric biosensor with a composite membrane sol-gel derived enzyme film and electrochemical generated poly(1,2-diaminobenzene) film, *Biosensors & Bioelectronics* 13: 67-73.

Zhang, Y.Q.; Shen, W.D.; Gu, R.A.; Zhu, J. dan Xue, R.Y., (1998), Amperometric biosensor for uric acid based on uricase-immobilized silk fibroin membrane, *Analytica Chimica Acta* 369(1-2): 123-128.

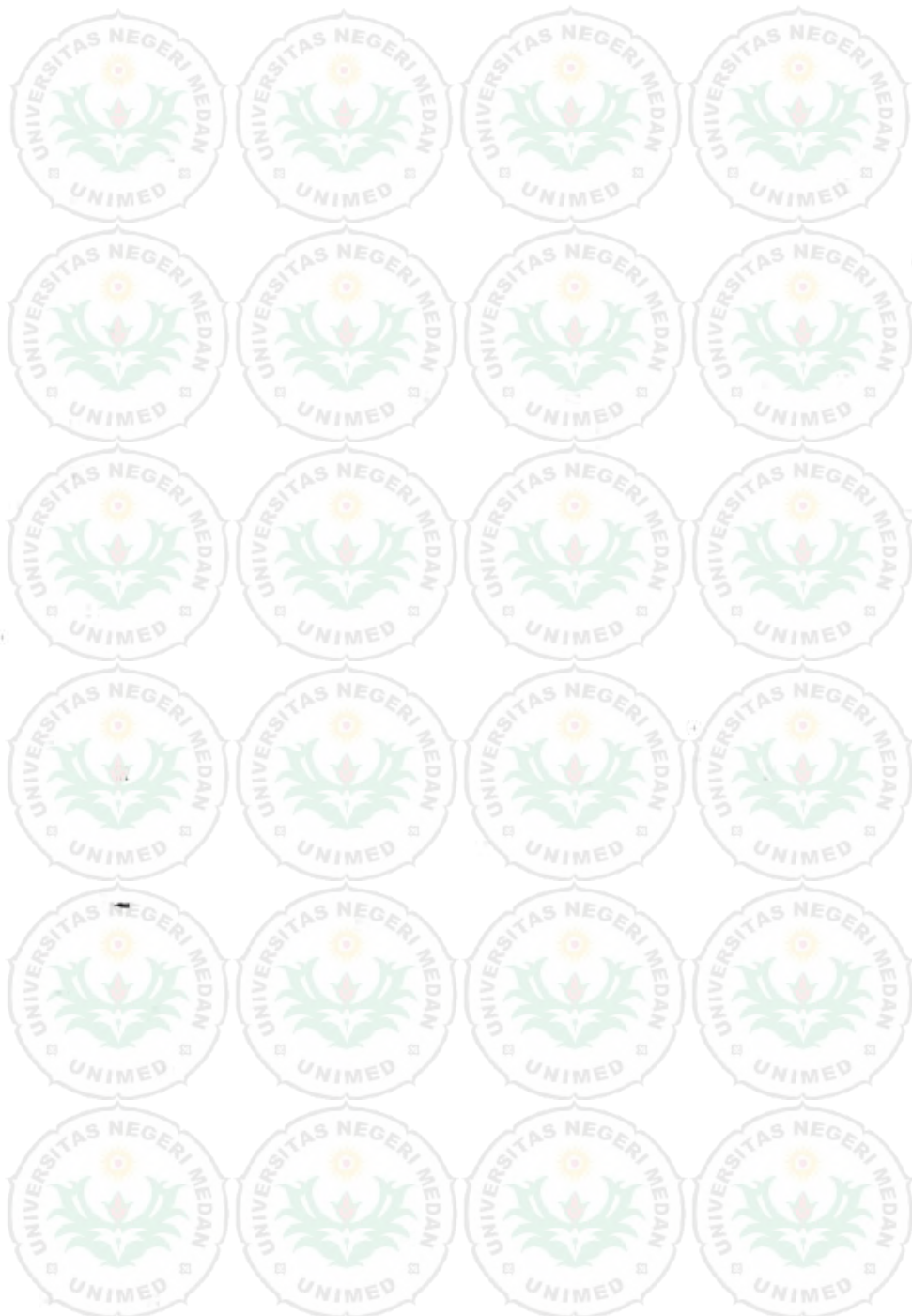


FIGURE CAPTIONS

- Fig 1. Cyclic voltammograms for electrodeposition of polytyramine onto platinised glassy carbon electrode at a scan rate of 0.5 V s^{-1} vs Ag/AgCl in 0.1 M tyramine dissolved in 0.05 M phosphate buffer, pH 6.0 containing uric oxidase. The numbers on the curves indicate the cycle number.
- Fig 2. Typical current-time curve of steady state current measurement as a function of uric acid concentration: a-k represents the successive injection of 0.0, 0.1 mM, 0.5, 0.8, 1.0, 1.3, 1.5, 1.8, 2.0, 2.2, and 2.5 mM uric acid into phosphate buffer solution (0.05 M, pH 6.0) containing 4% Li_2CO_3 . The membrane was coated between -0.01-1.6 V vs Ag/AgCl at $0. \text{ V s}^{-1}$ for five cycle in a degassed solution of 0.1 M tyramine and 0.3 M NaOH in methanol.
- Fig 3. The reproducibility of the uric acid biosensor: variation in the uric acid calibration curves for immobilised uric oxidase enzyme electrodes prepared on different days for 5 electrodes. The membrane was coated between -0.1 and 1.7 V vs Ag/AgCl at 0.5 V s^{-1} for three cycles in 0.1 M tyramine containing 2 mg/ml UOx in methanol-phosphate buffer (1:3).
- Fig 4. Calibration plots for uric acid biosensors as a function of the number of voltammetric cycles for which the polytyramine films were grown on a platinised glassy carbon electrode. Sweep rate 0.5 V s^{-1} Potential limits -0.1 V , $+1.7 \text{ V}$. Electrolyte: 0.1 M tyramine containing UOx in methanol-phosphate buffer (1:3). Electropolymerization were conducted at (o) one cycle (■) 3 cycles, (Δ) 5 cycles, (\bullet) 7 cycles and (\square) 10 cycles.

Fig. 5. The stability of the uric acid biosensors for repeated measurements of uric acid standard solution, between measurements the electrode was differently: (1) stored room temperature, (2) stored in phosphate buffer solution at room temperature, (3) stored dry at 4°C, and (4) stored in buffer solution at 4°C. One enzyme electrode was prepared with the enzyme entrapped with in the polytyramine film coupled to the polymer matrix with EDC/NHS. Other experimental parameters are as in figure 3.

Fig. 6. Relative response of GC/Pt/PtY/UOx electrodes to 1 mM uric acid, interferent and its mixture with uric acid for the electrode constructed at various sweep cycles. Other experimental parameters are as in figure 3

Fig 7. Correlation plot for uric acid values in food samples as determined by the present uric acid biosensor and by the standard spectrophotometric method. The best fit line is drawn

Table Captions

- Table 1 Properties of enzyme electrodes and the activity of enzyme for polytyramine/UOx electrodeposited by increasing voltammetry cycles
- Table 2. The response of uric acid biosensor for the analysis of 1 mM uric acid (alone) and the mixture of uric acid with various types of substances that possibly present in the sample which are suspected as interfering agents.
- Table 3. The analysis of uric acid in reference standard samples by two methods, the uric acid biosensor and the standard spectrophotometric method. The values are the averages from three measurements

Fig 1.

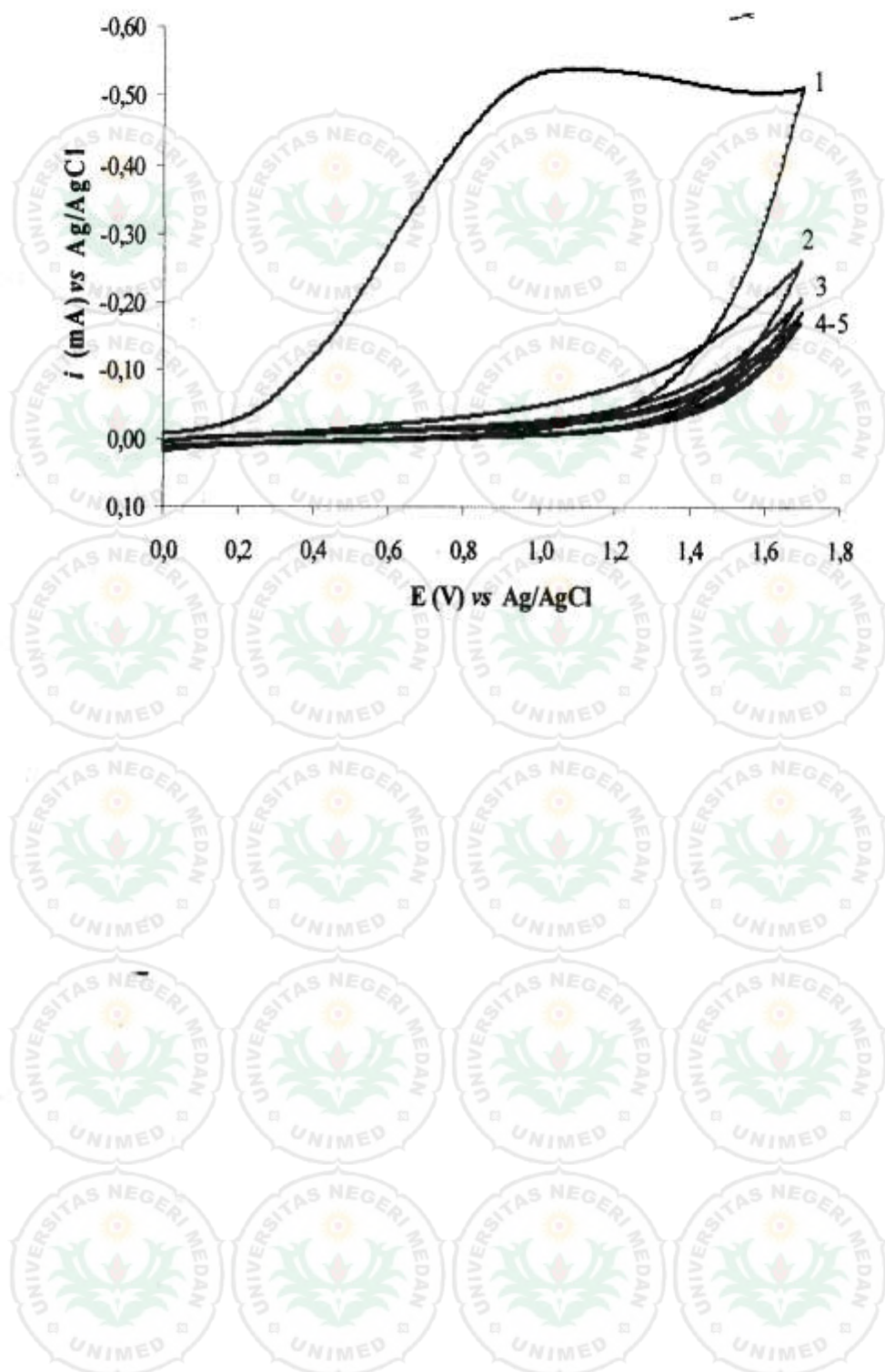


Fig 2

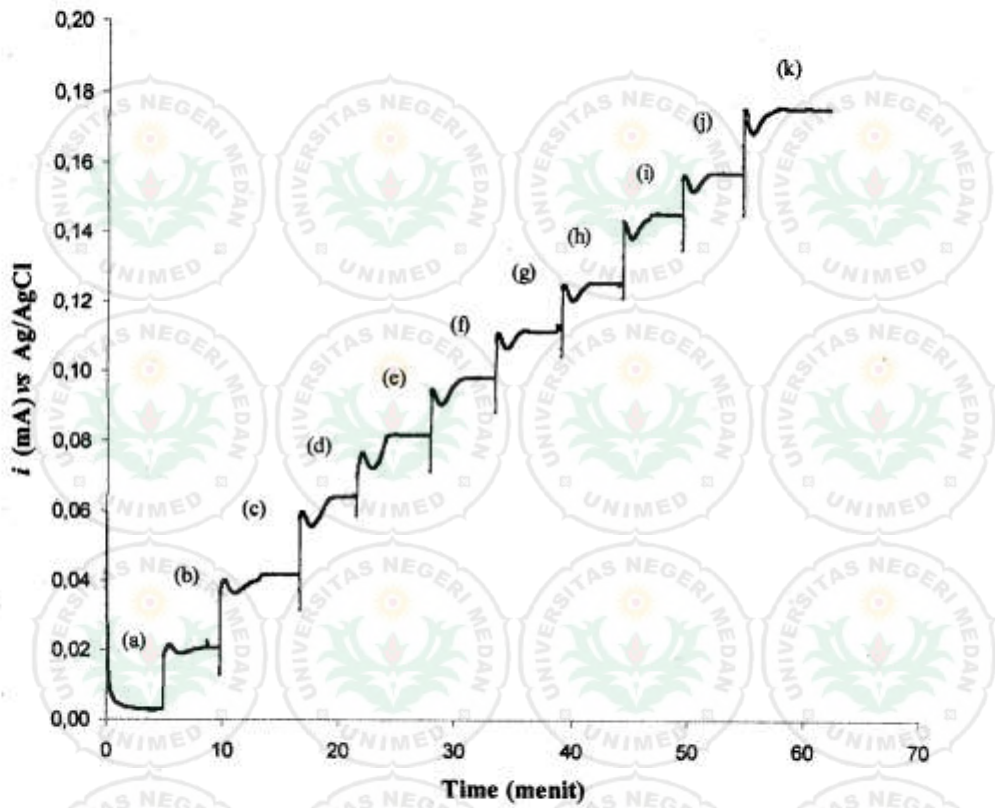


Fig 3.

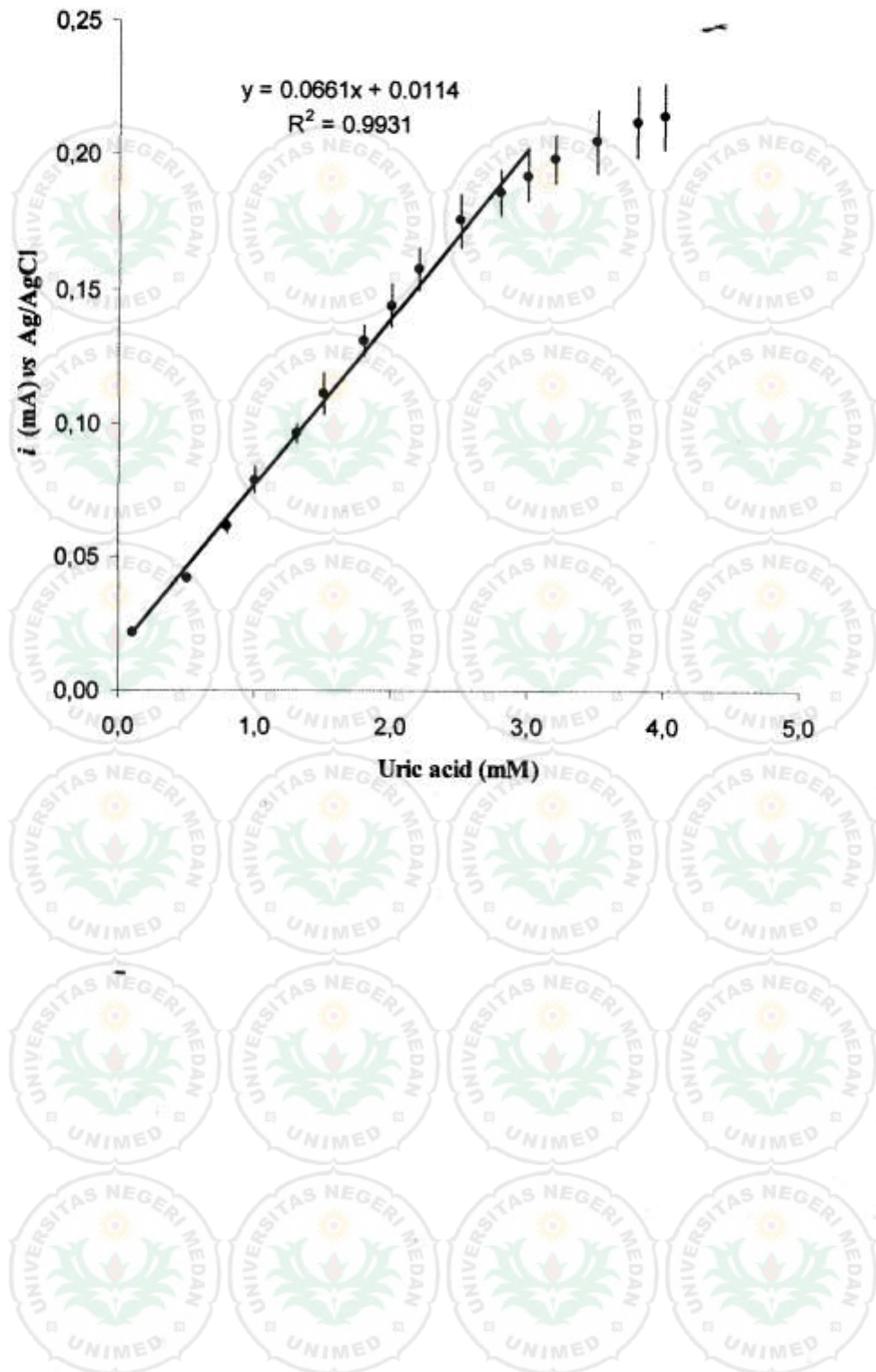


Fig 4.

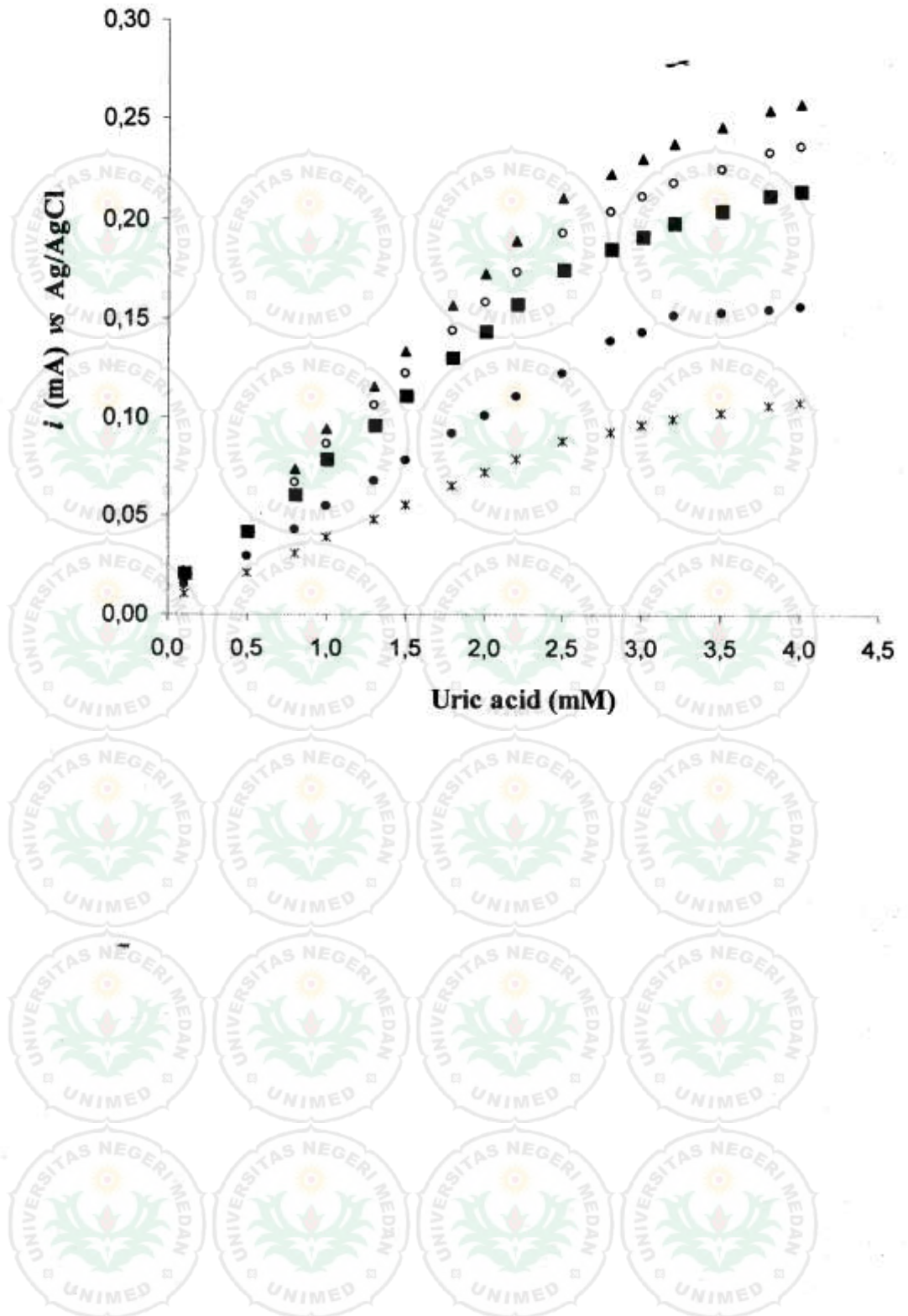


Fig. 5

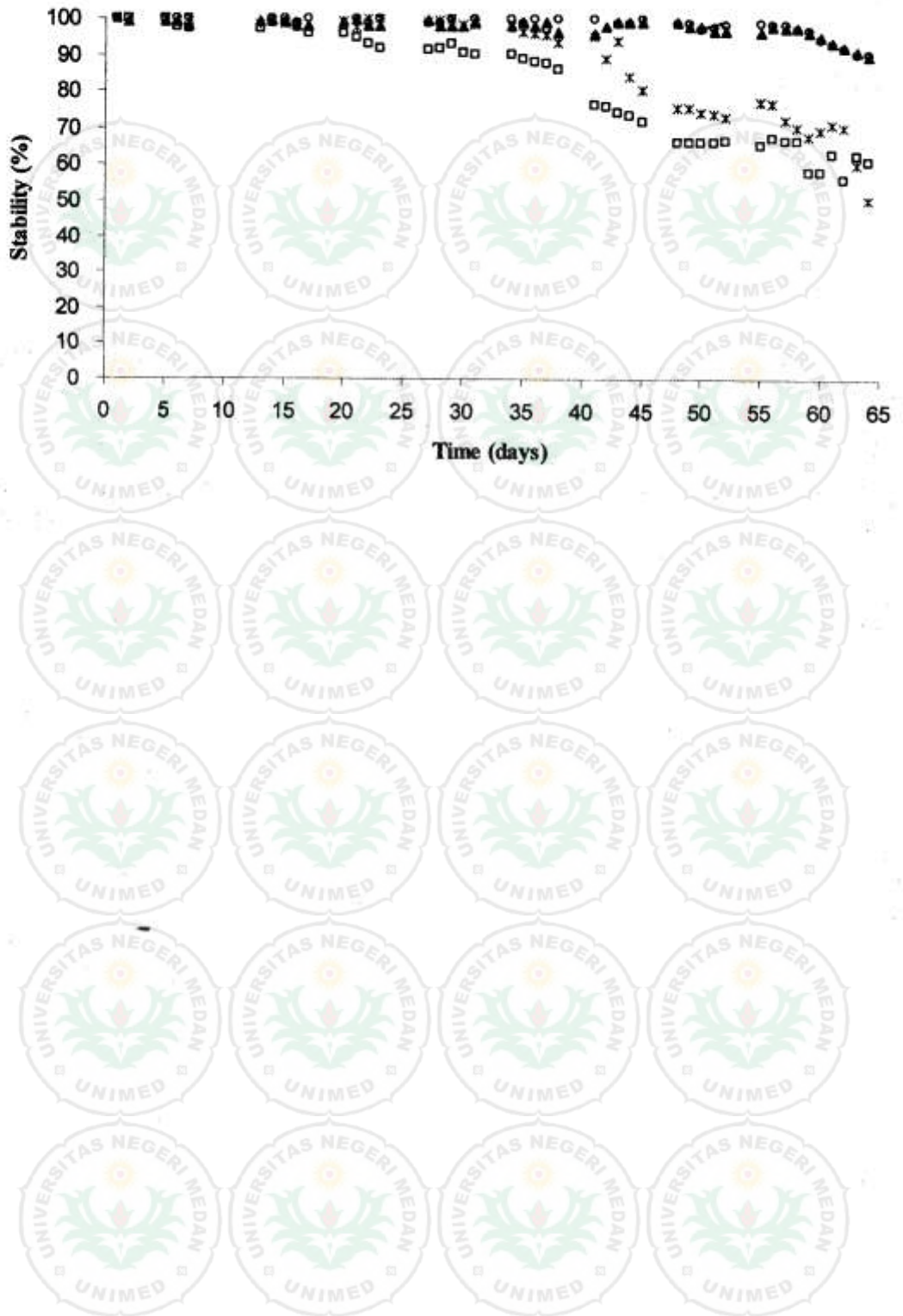


Fig 6.

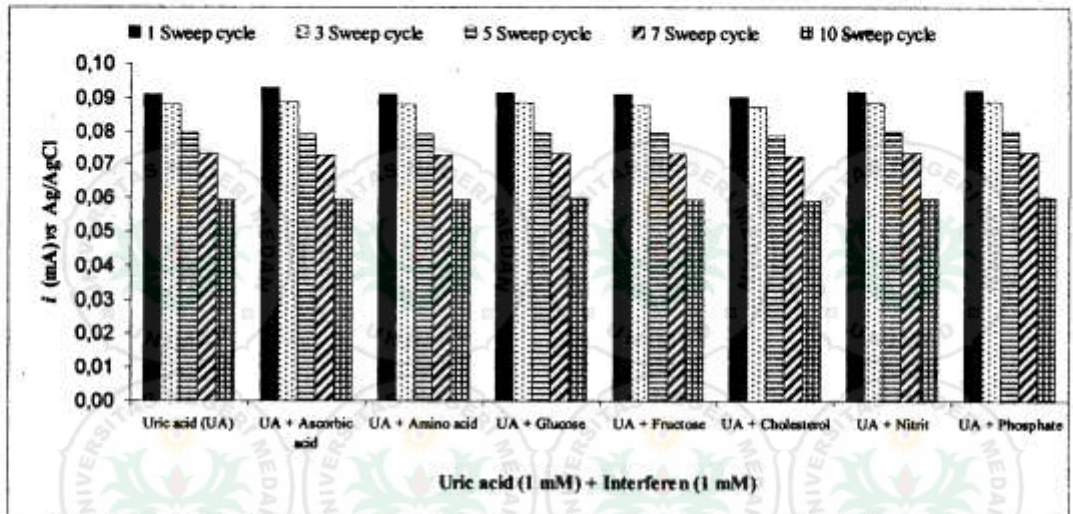


Fig 7

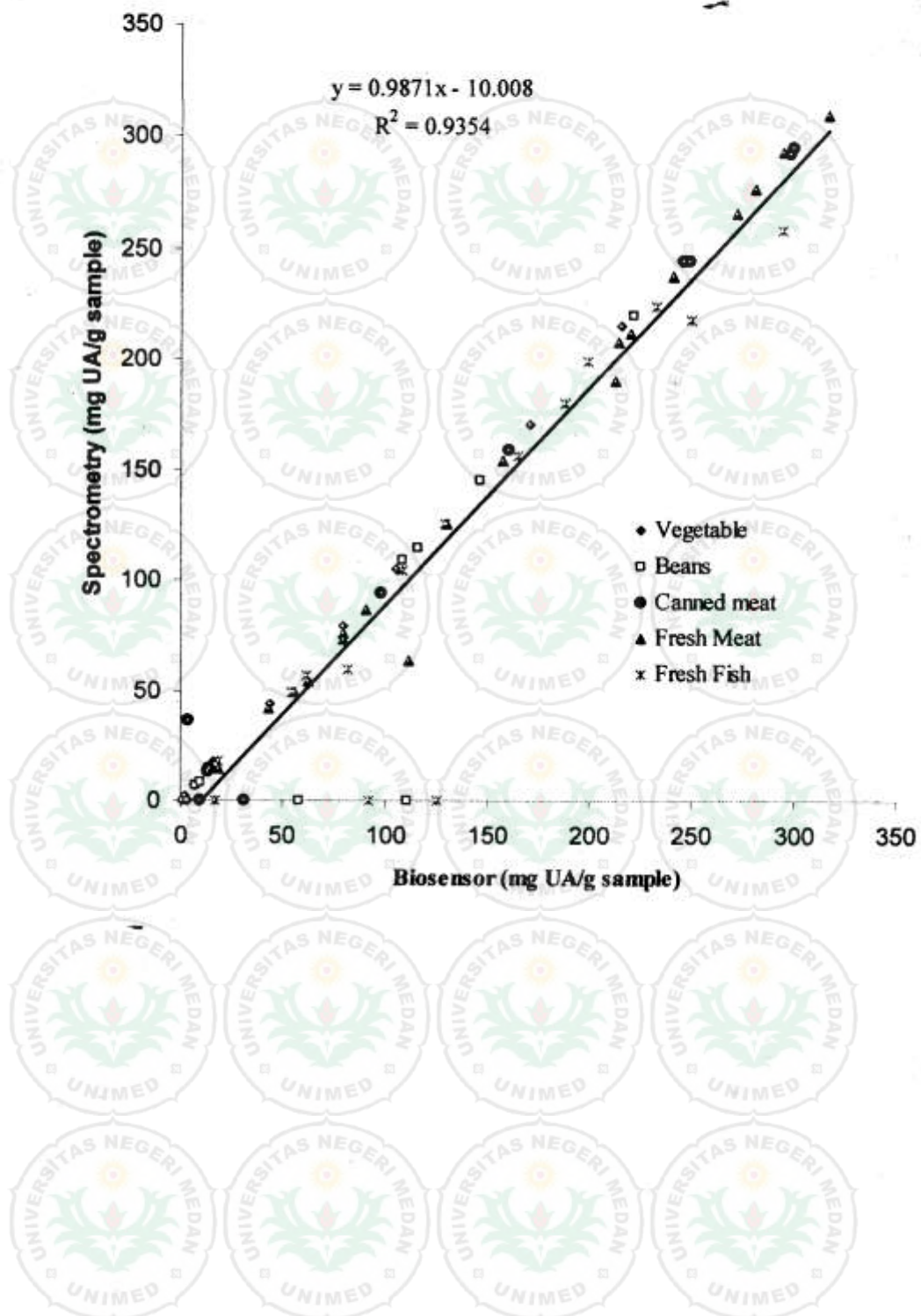


Table 1.

Cyclic voltmetry, CV (<i>sweep cycle</i>)	Total area CV (cm^2) [*]	Deposited Polytyramine (mmol) ^{**}	Biosensor Sensitivity (Slope mA/mM) ^{***}
1	0.11002	0.0323	0.0815
3	0.13196	0.0405	0.0739
5	0.14299	0.0419	0.0661
7	0.15058	0.0442	0.0463
10	0.15894	0.0466	0.0330

^{*} Area was calculated by using hydrodynamic method with rotating disc electrode (RDE)

^{**} Calculated based on the current needed during electropolymerization

^{***} Sensitivity was calculated from calibration curve of uric acid standard solution

Table 2

No	Standard and Interfering agents (1mM)	Response of Electrochemical Biosensor (mA)* for samples		
		Single substances (1 mM)	Uric acid and Interfering agents (1 mM)	Differences**
1	Uric acid	0.0793±0.003	0.0793±0.003	0.0000
2	Ascorbic acid	0.0512±0.005	0.0812±0.005	-0.0019
2	Amino acid	0.0012±0.003	0.0793±0.003	-0.0000
3	Glucosa	0.0020±0.001	0.0796±0.002	0.0003
4	Fructosa	0.0003±0.002	0.0793±0.002	0.0000
5	Cholesterol	0.0007±0.001	0.0787±0.002	-0.0006
6	Nitrit (NO ₂ ⁻)	0.0009±0.003	0.0798±0.003	0.0005
7	Phosphate (PO ₄ ³⁻)	0.0010±0.005	0.0800±0.005	0.0007

*Average from 5 measurements and its variation

**Calculated from the different between the current of uric acid and the mixture of uric acid with interferen

Table 3.

Reference standar Sampel (Sigma Co.)	Uric acid (mM)			Recovery	
	Lable*	Spectrophotomtry		Standard methodr	Biosen- sor
		UV-Vis**	Biosensor***		
Accutrol Normal	0.0327	0.0315±0.0008	0.0333±0.0001	96	102
Accutrol Elevated	0.0518	0.0490±0.0007	0.0520±0.0004	95	100
Uric acid standard 1	0.0291	0.0291±0.0008	0.0296±0.0003	100	102
Uric acid standard 2	0.0333	0.0316±0.0031	0.0339±0.0001	95	102
Uric acid standard 3	0.0345	0.0339±0.0017	0.0349±0.0003	98	101
Uric acid standard 4	0.0327	0.0320±0.0023	0.0335±0.0001	98	102

* The content of uric acid obtaint from supplier (Sigma Co.)

**Spectrophotometry method was conducted by using *o*-dianisidine at λ 520 nm

***Biosensor was conducted at a constant potential $E=0.60$ mV vs Ag/AgCl