

**KARAKTERISASI UREA DALAM LARUTAN BUFFER
MENGUNAKAN ENZIM UREASE DENGAN
METODE POTENSIOMETRI**

Abd Hakim S

Prodi Fisika FMIPA Universitas Negeri Medan,
Jln. Williem Iskandar Psr V Medan 20221, Indonesia.

Email : abdhakims07@gmail.com

ABSTRAK

Metode potensiometri merupakan metode mengukur beda-potensial keseimbangan antara elektroda indikator dan elektroda referensi tanpa mempertentangkan sel elektrokimia. Metode potensiometri bermanfaat sebagai alat uji klinik dan analisis biologi. Karakteristik potensial elektroda dilakukan dengan mendeteksi potensial dari molaritas dan pH larutan buffer menggunakan enzim urease melalui injeksi urea pada konsentrasi rendah, volume injeksi urea dan penentuan reaksi larutan apakah reversibel atau irreversibel. Bahan yang digunakan untuk larutan adalah buffer tris-HCl, buffer fosfat, KCl dan enzim urease sebagai analit urea. Hasil karakterisasi urea dalam larutan mempunyai respon terbaik pada volume injeksi dan molaritas urea (0.3 mL 0.001 M) untuk buffer tris-HCl pH 5.5 dan buffer fosfat pH 7.5, sedangkan (0.4 mL 0.001 M) dalam KCl 0.01 M. Kurva kalibrasi larutan buffer tris-HCl dan fosfat serta KCl tergolong reversibel perbedaan potensial (tegangan) lebih besar 100 mV.

Kata Kunci: Urea, KCL, Enzim Urease, Buffer Tris-HCL dan Buffer Fosfat.

PENDAHULUAN

Metode potensiometri bermanfaat sebagai alat uji klinik dan analisis biologi. Uji klinik dalam penelitian ini uji urea sebagai analit urea dari sel potensiometri. Sel potensiometri memerlukan bahan larutan elektrolit yang terdiri dari buffer, enzim sebagai analit dengan komposisi tertentu agar diperoleh hasil yang optimum. Buffer yang dikarakterisasi yaitu buffer tris-HCl dan buffer fosfat yaitu molaritas dan pH bercampur dengan 0.01 KCl. Karakterisasinya menurut (Lue dkk, 2011) urea dalam buffer apakah memiliki respon rendah, tinggi atau jenuh dan (Rajesh dkk, 2014) apakah ada interferen atau pengganggu dalam larutan campuran buffer. Respon waktu bergantung pada tegangan sel potensiometri dalam selang waktu penggunaan. Selain itu juga diperlukan respon volume dan waktu injeksi urea

BAHANDAN METODE

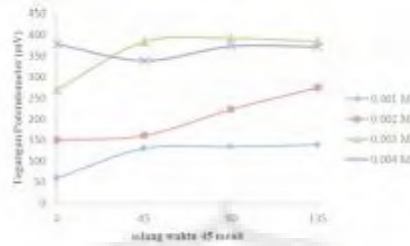
Bahan kimia yang dipergunakan dalam penelitian ini adalah senyawa proanalisis (PA) diantaranya amonia standar, KCl, buffer potasium fosfat KH_2PO_4 , buffer trisma HCl, *platicizer* KTpCIPB, tetra hydro furon (THF), PVA (poly vinyl alcohol) ($\text{CH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{-n}$), semua diperoleh dari Sigma Chem. Co. Enzim yang digunakan dalam penelitian adalah Uriase, EC 3.5.1.5 (Urea) U4002, 50 - 100 ku tipe ix. Berbagai jenis zat lain yang tidak diperinci diperoleh dari Sigma Chem. Co., Ajac Chem., Merle dan BioLab.

Pembuatan buffer fosfat, KH_2PO_4 0.0342 g + KCl 0.1491 g dilarutkan dalam aquades di labu ukur 250 mL menghasilkan KH_2PO_4 0,001 M dan KCl 0.01 M untuk mendapatkan buffer fosfat pH 4.5 tambahkan NaOH 0.1 M demikian setrusnya hingga diperoleh pH 5, pH 5.5, pH 6, pH 6.5, pH 7, pH 7.5. Dengan cara yang sama dilakukan juga untuk pembuatan buffer tris-HCl (Trisma HCl 0.0390 g + KCl 0.1860 g + Aquades 250 mL) sehingga menghasilkan pH 5.5, pH 6. Untuk analisis urea, standar kalibrasi (10-1000 mM) disiapkan oleh pengenceran larutan stok urea (1.0 mM) dalam 100 mM buffer fosfat pH 7,2 (Mishra dkk, 2014).

HASIL DAN PEMBAHASAN

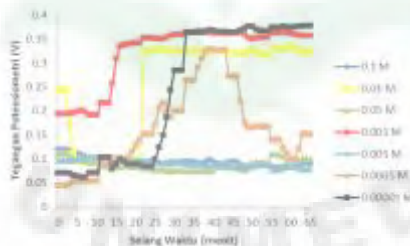
Pengaruh molaritas urea 0.001 M, 0.002 M, 0.003 M dan 0.004 M dalam buffer trisma HCl pH 5.5 10 mL ditambah enzim urease 10 μL hasilnya dapat dilihat pada gambar 1. Respon waktu terhadap tegangan output diukur dalam 0-30 mM urea (Lue dkk, 2011) dalam tiga klasifikasi respon rendah, respon menengah dan wilayah saturasi dapat dilihat pada gambar 2.

Buffer tris-HCl berasal dari 0,0390 g ditambah KCl 0,1860 g dilarutkan dalam aquades 250 mL kemudian diukur pH nya dengan pH meter, untuk menaikkan pH ditambahkan NaOH 0,1 M hingga diperoleh pH 5.5. Larutan buffer trisma HCl pH 5.5 diambil 10 mL ditambahkan enzim urease 10 μL diaduk dengan stirer dalam gelas ukur yang sudah dilengkapi elektroda referensi RE-5B Ag/AgCl MF-2052 dan elektroda indikator wolfram kemudian diukur tegangan potensiometer sebagai fungsi waktu selama 45 menit melalui injeksi urea 0.001 M, 0.002 M, 0.003 M, 0.004 M.

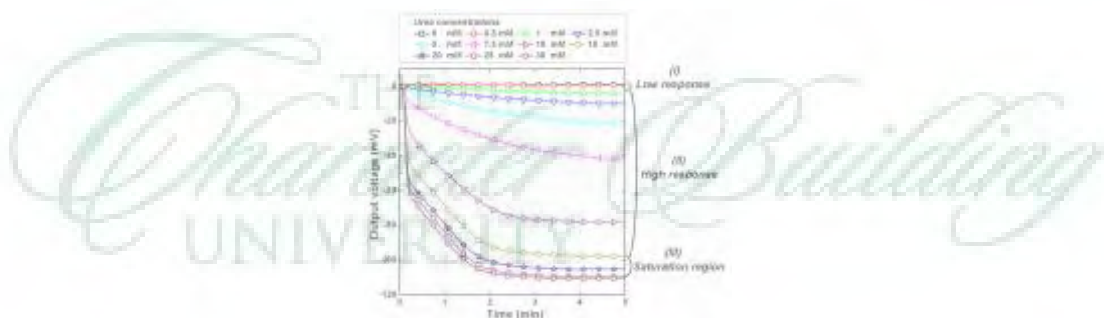


Gambar 1. Respon Waktu Urea menggunakan enzim dalam larutan buffer trisma HCl pH 5.5

Pengaruh molaritas urea 0.1 M, 0.01 M, 0.05 M, 0.001 M, 0.005 M, 0.0005 M dan 0.00001 M dalam buffer fosfat pH 7.5 10 mL ditambah enzim urease 10 μ L hasilnya dapat dilihat pada gambar 2. Metode analisis injeksi merupakan metode yang digunakan untuk menentukan lebar puncak (Ohura and Imato, 2011). Hubungan antara E dan oksidasi tergantung pada rasio konsentrasi, elektroda redoks menunjukkan respons Nernstian oleh potensial buffer pada konsentrasi rendah 10^{-5} M (Ohura and Imato, 2011).



Gambar 2. Respon Waktu Urea menggunakan enzim dalam larutan buffer fosfat pH 7.5



Gambar 3. Respon waktu terhadap tegangan output diukur dalam 0-30 mM urea.

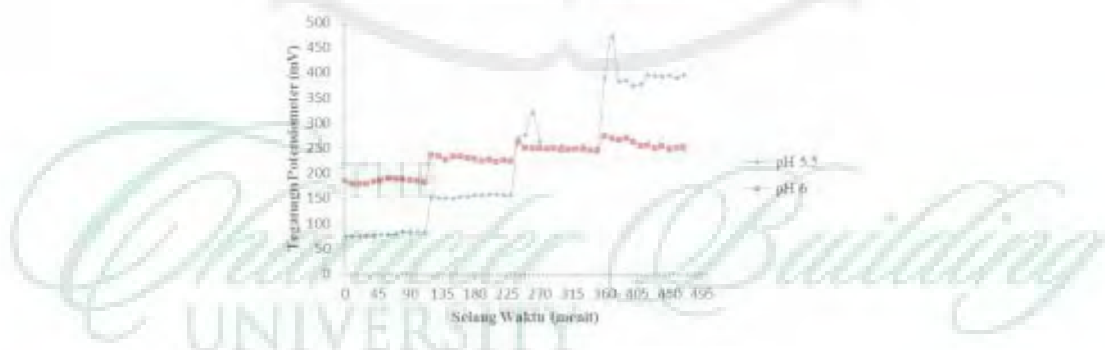
Konsentrasi urea sesuai gambar 3 menurut (Lue dkk, 2011) dapat dimaknai menurut kategori respon rendah, respon tinggi dan respon jenuh. Gambar 1 mempunyai respon tinggi pada konsentrasi 0.001 M urea dalam buffer trisma HCl pH 5.5 demikian

juga dengan gambar 2 mempunyai respon tinggi pada konsentrasi 0.001 M buffer fosfat pH 7.5 dilihat menurut gambar 3.

Menurut metode enzim aktif oleh (Lin dkk, 2015), pH buffer tris-HCl dapat ditingkatkan ditambah NaOH hingga diperoleh pH 5.5 dan pH 6 bercampur dengan larutan enzim 10 μ L, kemudian buffer dioptimasi untuk enzim aktif dan waktu inkubasi.

Buffer pH 5.5, pH 6 diinjeksi urea 0.001 M, 0.002 M, 0.003 M, dan 0.004 M dalam selang waktu 45 menit hasilnya dapat dilihat pada gambar 3, demikian juga buffer fosfat pH 4.5, pH 5, pH 6, pH 7, dan pH 7.5 diinjeksi urea secara berurutan 1 M, 0.5 M, 0.3 M, 0.25 M, 0.2 M dan 0.125 M dalam selang waktu 45 menit hasilnya dapat dilihat pada gambar 4.

Berdasarkan gambar 2 digunakan larutan buffer fosfat 0,001 M berasal dari 0.0342 g KH_2PO_4 ditambah KCl 0.149 g dalam aquades 250 mL, untuk menaikkan pH tambahkan NaOH 0,1 M hingga diperoleh pH 4.5 -9.5. Larutan buffer KH_2PO_4 pH 4.5 diambil 10 mL ditambahkan enzim urease 10 μ L diaduk dengan stirer dalam gelas ukur yang sudah dilengkapi elektroda referensi RE-5B Ag/AgCl MF-2052 dan elektroda indikator wolfram kemudian diukur tegangan potensiometer sebagai fungsi waktu selama 45 menit seperti terlihat pada gambar 4 melalui injeksi urea setiap injeksi 0.1 M, 0.01 M, 0.05 M, 0.001 M, 0.005 M, 0.0005 M dan 0.00001 M, ada pengaruh pH buffer dan molaritas injeksi (García dkk, 2011).



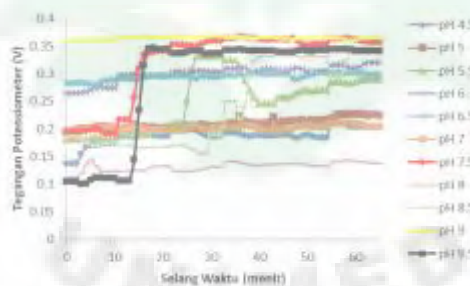
Gambar 4. Respon waktu larutan buffer Trisma HCl pH 5.5 dan pH 6 menggunakan enzim urease 10 μ L dalam selang waktu 45 menit injeksi urea secara berurutan 1 mM, 2 mM, 3 mM, dan 4 mM.

Efek pH pada potensial elektroda dengan berbagai konsentrasi dipelajari dengan menambahkan larutan 1 M HCl (menurunkan pH) atau 1 M NaOH (meningkatkan pH)

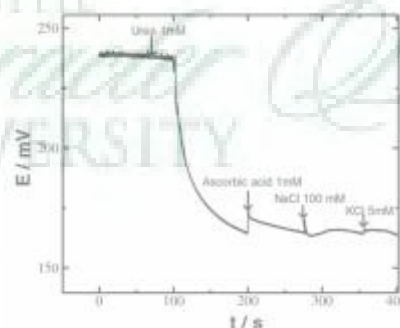
(Baharuddin dkk, 2014). Pada penelitian yang digunakan 0.1 M NaOH dilakukan pengenceran 1 M NaOH.

Rajesh dkk (2014) respon potensiometri terhadap 1 mM urea di dalam buffer Tris-HCl dengan penambahan 1 mM asam askorbat dan juga setelah penambahan berikutnya 100 mM NaCl dan 5 mM KCl dilihat pada gambar 6. Konsentrasi NaCl dan KCl ini dipilih berdasarkan tingkat normal konsentrasi yang ada dalam darah manusia dan serum.

Berdasarkan gambar 3 dan gambar 6, buffer tris HCl pH 5.5 pada gambar 4 memiliki respon potensiometri bagus, tetapi ada pengaruh gangguan buffer tris-HCl bercampur larutan enzim 10 µL dan KCl, sedangkan pH 6 tidak terdapat gangguan hanya tinggi puncaknya rendah dibandingkan pH 5. Demikian juga gambar 5 buffer fosfat pH 7.5 yang memiliki respon tinggi pada pH 7.5 sedangkan respon jenuh pada pH 9.5 dan respon rendah pada pH 9.



Gambar 5. Respon waktu larutan larutan buffer KH_2PO_4 dengan variasi pH 4.5– 9.5 menggunakan enzim urease 10 µL injeksi urea secara berurutan 0.1 M, 0.01 M, 0.05 M, 0.001 M, 0.005 M dan 0.00001 M dalam selang waktu 10 menit.



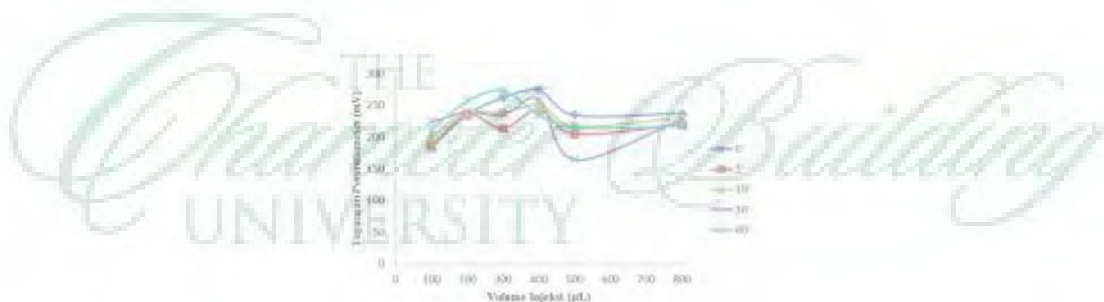
Gambar 6. Pengaruh interferensi asam askorbat (1 mM), NaCl(100 mM), dan konsentrasi KCl (5 mM) pada potensiometri (Rajesh dkk, 2014).

Ohura dan Imato (2011), Potensial larutan buffer terdiri dari pasangan redoks menggunakan metode elektrokimia *reversible* dan memenuhi persamaan Nernst. Karakteristik potensial elektroda mendeteksi komposisi potensial larutan buffer melalui injeksi urea yaitu 1) respon potensial dasar adalah stabil adalah direproduksi (*reproducible*) dalam larutan buffer pada konsentrasi rendah, 2) perubahan komposisi larutan buffer adalah perubahan potensial yaitu tingginya puncak sebanding dengan konsentrasi dari sampel, 3) rentang konsentrasi dapat diukur melalui konsentrasi larutan buffer yang digunakan. Metode potentiometri melibatkan pendeteksian perubahan keseimbangan potensial atau potensial transien.

Ulianas dkk (2011), efek pH larutan enzim urease dalam larutan buffer phosphate dari pH 6.5 sd 8 dengan modifikasi larutan enzim urease pada 0.5 mL dalam tiap 10 menit sebelum bercampur dengan 2.5 mL larutan urea 1 M.

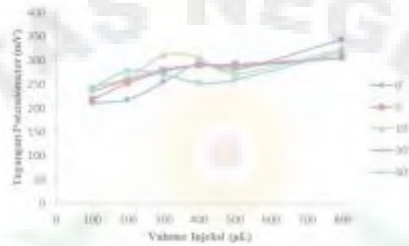
Efek pH dari buffer tris-HCl 0.001 M pH 5.5 dan pH 6 dapat dilihat pada gambar 3, terpilih 0.001 M buffer tris-HCl pH 5.5 molaritas jauh lebih kecil dibandingkan dengan (Zhang dkk, 2013) 0.05 M buffer tris-HCl, sedangkan efek pH buffer phosphate dari pH 4.5 - 9.5 dapat dilihat pada gambar 4 punya respon yang baik terpilih buffer fosfat pH 7.5 dalam larutan enzim urease 10 μL , jauh lebih kecil dari (Ulianas dkk, 2011) larutan enzim urease pada 0.5 mL.

Beaker gelas masing-masing berisi (1) buffer Trisma HCl 0.001 M pH 6 dan KCl 0.01 M, (2) buffer fosfat 0.001 M pH 6 dan KCl 0.01 M serta enzim urease 10 μL , dalam selang waktu 45 menit dilakukan injeksi urea secara berurutan 100 μL , 200 μL , 300 μL , 400 μL , 500 μL dan 800 μL , hasilnya dapat dilihat pada gambar 7.

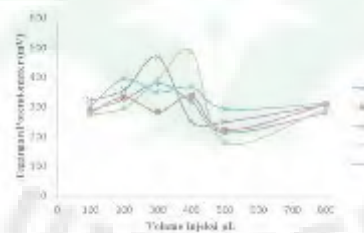


Gambar 7. Respon volume dan waktu injeksi urea dalam larutan buffer Trisma HCl 0.001 M pH 6 dan KCl 0.01 M menggunakan enzim urease 10 μL injeksi urea secara berurutan 100 μL , 200 μL , 300 μL , 400 μL , 500 μL dan 800 μL terbaik dalam selang waktu 60 menit volume 300 μL .

Volume injeksi maksimum 300 μL (0.3 mL) dari buffer Trisma HCl 0.001 M pH 6 dalam selang waktu 60 menit. Gambar 8 volume injeksi maksimum 300 μL (0.3 mL) buffer fosfat 0.001 M pH 6 dalam selang waktu 30 menit. Gambar 9 volume injeksi maksimum 400 μL (0.4 mL) untuk KCl 0.01 M dalam selang waktu 10 menit. Berdasarkan data di atas ada pengaruh volume dan waktu injeksi urea dalam buffer dan KCl menggunakan enzim.



Gambar 8. Respon volume dan waktu injeksi urea dalam larutan buffer fosfat 0.001 M pH 6 menggunakan enzim urease 10 μL injeksi urea secara berurutan 100 μL , 200 μL , 300 μL , 400 μL , 500 μL dan 800 μL terbaik dalam selang waktu 10 menit volume 300 μL .



Gambar 9. Respon volume dan waktu injeksi urea dalam larutan KCl 0.01 M menggunakan enzim urease 10 μL injeksi urea secara berurutan 100 μL , 200 μL , 300 μL , 400 μL , 500 μL dan 800 μL terbaik dalam 10 menit volume 400 μL .

Kondisi optimal laju alir 0.5 mL / menit, volume sampel 0.1 mL respon waktu 90 detik dalam 100 mM buffer fosfat (PB) pH 7,2 (Mishra dkk, 2014). Larutan stok urea (1.000 mM) disiapkan sebagai injeksi dalam 100 mL PB (100 mM, pH 7,2). Perubahan respon volume Cl^- 0,04 mL dari 0,1 M KCl hingga 100 mL $1,0 \times 10^{-3}$ M KCl terdeteksi oleh elektroda EIMES-30 (Wang dkk, 2016).

Selama reaksi redoks analit dengan buffer berpotensi sebagai perantara, penentuan analit yang sangat sensitif dapat dicapai, asalkan substansi dalam sistem FIA dapat dideteksi (Ohura dkk, 2011) Potensial dari ISE biosensor urea mengikuti persamaan Nernst (Ismail dkk, 2014) :

$$E_c = E_{c_0} + S \log C \quad (1.1)$$

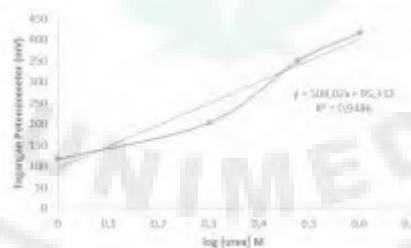
Respon tegangan dari ISE biosensor urea berubah menjadi :

$$E_c - E_{c_0} = S \log C \quad (1.2)$$

$$\Delta = S \log C \quad (1.3)$$

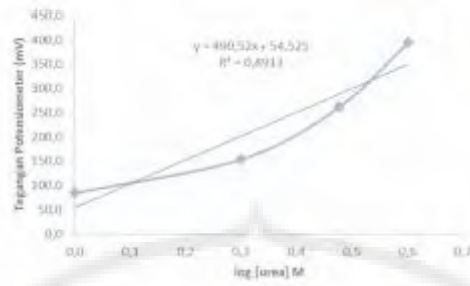
Kurva kalibrasi dibuat dalam hubungan log konsentrasi M terhadap tegangan potensiometer (Chey dkk, 2012) dan konsentrasi M (Mishra dkk, 2014), sedangkan (Ismail dan Adeloju, 2010) kurvakalibrasi dalam log konsentrasi pH terhadap tegangan potensiometer.

Berdasarkan eksperimen ini kalibrasi dalam log konsentrasi M terhadap tegangan potensiometer digunakan untuk buffer tris-HCl 0.001 M, 0.002 M, 0.003 M, 0.004 M, hasilnya dapat dilihat pada gambar 10 untuk pH 5.5 dan gambar untuk 11 pH 6. Kalibrasi buffer fosfat dalam log konsentrasi pH terhadap tegangan potensiometer dapat dilihat pada gambar 12, demikian juga dengan KCl 0.01 M pH 6 dapat dilihat pada gambar 13 masing-masing menunjukkan kurva kalibrasi memiliki kemiringan 508.02 mV/decade buffer tris-HCl pH 5.5, 490.52 mV/decade buffer tris-HCl pH 6, 124.16 mV/decade buffer fosfat pH 6, 0.1827 mV/decade KCl 0.01 M pH 6.

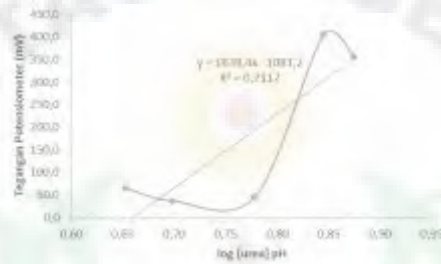


Gambar 10. Kurva kalibrasi urea dalam larutan buffer tris-HCl pH 5.5.

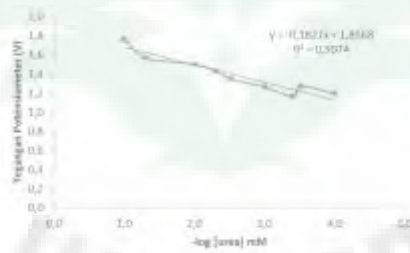
Tegangan antara puncak oksidasi dan reduksi (Rahman dkk, 2008) secara teoritis 59 mV untuk suatu reaksi dapat balik (*reversible*), dalam praktek secara khas 70-100 mV. Perbedaan potensial (tegangan) lebih besar 100 mV merupakan puncak oksidasi dan reduksi *nonsymmetric* menunjukkan reaksi *nonreversible* (*irreversible*). Menurut (Rahman dkk, 2008), buffer tris-HCl pH 5.5, pH 6, buffer fosfat pH 6 bersifat *irreversible*, KCl 0.01 M pH 6 bersifat *reversible*.



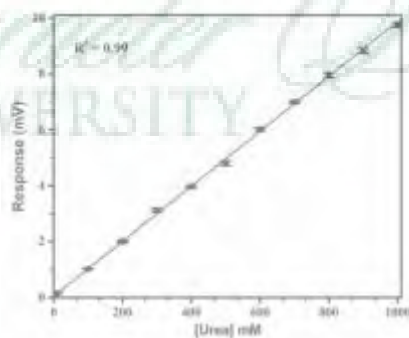
Gambar 11. Kurva kalibrasi urea dalam larutan buffer tris-HCl pH 6.



Gambar 12. Kurva kalibrasi urea dalam larutan buffer fosfat pH 4.5 – pH 7.



Gambar 13. Kurva kalibrasi larutan KCl 0.01 M pH 6 menggunakan enzim urease 10 μ L injeksi urea secara berurutan 1 M, 0.5 M, 0.3 M, 0.25 M , 0.2 M dan 0.125 M.



Gambar 14. Kurva kalibrasi biosensor FIA-ET menurut (Mishra dkk, 2014)

Kurva kalibrasi buffer dan KCl gambar 10-13 untuk sel potensiometri yang terdiri dari elektroda indikator dan elektroda referensi masih diperlukan pengembangan perbaikannya seperti terlihat gambar 14 sudah menggunakan biosensor.

KESIMPULAN

Larutan buffer beserta enzim urease bersifat reversibel artinya tidak dapat digunakan dalam waktu lama sebagai analit urea.

UCAPAN TERIMAKASIH

Diucapkan terimakasih kepada Universitas Negeri Medan sebagai tempat mengambil data penelitian dan Universitas Negeri Sumatera Utara sebagai tempat saya melanjutkan studi S3 untuk pengembangan material sains.

DAFTAR PUSTAKA

- Baharuddin, N. H., Sulaiman, N. M. N., and Aroua, M. K., (2014), *Unmodified starch as water-soluble binding polymer for chromium ions removal via polymer enhanced ultrafiltration system*, Baharuddin et al. *Journal of Environmental Health Science & Engineering* 2014, 12:61
- Chey, C. O., Ibupoto, Z. H., Khun, K., Nur, O., and Willander, M., (2012), *Indirect Determination of Mercury Ion by Inhibition of a Glucose Biosensor Based on ZnO Nanorods*, *Sensors* 2012, 12, 15063-15077
- García, M. S., Ortuño, J. A., Cuartero, M., and Abuherba, M. S., (2011), *Use of a New Ziprasidone-Selective Electrode in Mixed Solvents and Its Application in the Analysis of Pharmaceuticals and Biological Fluids*, *Sensors* 2011, 11, 8813-8825;
- Ismail, A. A., Aroua, M. K., Yusoff, R., (2014), *Cadmium (II)-Selective Electrode Based on Palm Shell Activated Carbon Modified With Task-Specific Ionic Liquid: Kinetics and Analytical Applications*, *Int. J. Environ. Sci. Technol.* (2014) 11:1115-1126
- Ismail, F., and Adeloju, S. B., (2010), *Galvanostatic Entrapment of Penicillinase into Polytyramine Films and its Utilization for the Potentiometric Determination of Penicillin*, *Sensors* 2010, 10, 2851-2868
- Lin, L., Xiaofang, L., Yi, L., Quaxue, L., Xintian, L., Guowu, Y., (2015), *Development of Detection Method for Assaying Calf Intestine Alakline Phosphatase Aktive*, *Animal Husbandry and Feed Science*, 2015, 7 (3): 152-155.

- Lue, C. E., Yu, T. C., Yang, C. M., Pijanowska, D. G., and Lai, C. S., (2011), *Optimization of Urea-EnFET Based on Ta₂O₅ Layer with Post Annealing*, Sensors 2011, 11, 4562-4571.
- Mishra, G. K., Sharma, A., Deshpande, K., and Bhand, S., (2014), *Flow Injection Analysis Biosensor for Urea Analysis in Urine Using Enzyme Thermistor*, Appl Biochem Biotechnol (2014) 174:998–1009.
- Ohura, H., and Imato, T., (2011), *Rapid and Automated Analytical Methods for Redox Species Based on Potentiometric Flow Injection Analysis Using Potential Buffers*, Hindawi Publishing Corporation, *Journal of Automated Methods and Management in Chemistry*, Volume 2011, Article ID 516165, 14 pages.
- Rahman, M.A., Kumar, P., Park, D.S., and Shim, Y.B., (2008), *Electrochemical Sensors Based on Organic Conjugated Polymers*, Review, Sensors, 8, 118-141.
- Rajesh, Puri, N., Mishra, S. K., Laskar, M. J., Srivastava, A. K., (2014), *Microstructural and Potential Dependence Studies of Urease-Immobilized Gold Nanoparticles–Polypyrrole Composite Film for Urea Detection*, Appl Biochem Biotechnol (2014) 172:1055–1069.
- Rajesh, Puri, N., Mishra, S. K., Laskar, M. J., Srivastava, A. K., (2014), *Microstructural and Potential Dependence Studies of Urease-Immobilized Gold Nanoparticles–Polypyrrole Composite Film for Urea Detection*, Appl Biochem Biotechnol (2014) 172:1055–1069.
- Ulianas, A., Heng, L.Y., and Ahmad, M., (2011), *A Biosensor for Urea from Succinimide-Modified Acrylic Microspheres Based on Reflectance Transduction*, Article, Sensors 2011, 11, 8323-8338.
- Wang, S., Lifson, M. A., Chinnasamy, T., Inci, F., and Demirci, U., 2016, *Flexible Substrate-Based Devices for Point-of-Care Diagnostics*, Trends in Biotechnology, November 2016, Vol. 34, No. 11 Review

