

PENGEMBANGAN BIOSENSOR SEBAGAI INSTRUMEN ANALISIS UNTUK PENENTUAN KOLESTEROL DI DALAM MAKANAN TRADISIONAL

Manihar Situmorang^{*}, Pasar M. Silitonga^{*}, dan Isnaini Nurwahyuni^{}**

^{*}Jurusan Kimia, FMIPA, Universitas Negeri Medan, Jl. Willem Iskandar, Psr V,
Medan, Sumatera Utara, Indonesia 20221

^{**}Departemen Biologi, FMIPA, Universitas Sumatera Utara, Jl. Bioteknologi No.
1 Kampus USU Padang Bulan Medan, Sumatera Utara, Indonesia 20155

ABSTRACT

The development of a biosensor as instrumental analysis for the determination of cholesterol in traditional food is explained. The biosensor is constructed by immobilizing of enzyme cholesterol oxidase (COx) in deposited polytyramine (Pty) that is attach onto platinized glassy carbon electrode (GC/Pt). Cholesterol biosensor (GC/Pt/Pty/COx) developed in this study gave sensitive response to cholesterol, where the detection linearity lies between 0.01–1.0 mM cholesterol, slope 0.180 $\mu\text{A}/\text{mM}$ cholesterol, and the detection limit of 0.01 mM cholesterol. The biosensor has been applied for the determination of cholesterol in various types of North Sumatera traditional foods. The contents of the cholesterol in food samples are lies between 0.051–0.835 mM cholesterol. Cholesterol analysis with biosensor has agreed with standard spectrophotometric method for cholesterol ($R^2 = 0.979$).

Kata kunci: Analisis, biosensor, polytyramin, enzyme, kolesterol, makanan tradisional

PENDAHULUAN

Pencarian instrumen analisis untuk penentuan kadar kolesterol di dalam makanan sangat mendesak karena diketahui kolesterol dapat menyebabkan penyakit sehingga kehadiran senyawa ini pada kadar tertentu di dalam makanan harus dihindarkan. Instrumen analisis yang memiliki daya analisis akurat, selektif, sensitif, cepat dan sederhana untuk penentuan kolesterol di dalam makanan tradisional dapat memberikan informasi terhadap kehadiran senyawa yang dapat menyebabkan penyakit, sehingga memudahkan bagi konsumen untuk memilih makanan yang layak dikonsumsi sesuai dengan kebutuhan dan kondisi konsumen yang membutuhkan diet terhadap senyawa kolesterol.

Telah diketahui korelasi positif antara kadar total kolesterol dengan penyakit jantung koroner, dan kadar kolesterol serum tinggi merupakan indikator ketidak-

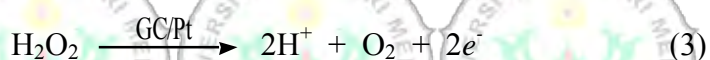
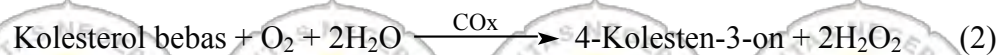
normalan metabolisme lemak (Sniderman dan Cianflone, 1999). Apabila metabolisme kolesterol terganggu, kolesterol serum terakumulasi dalam bentuk kolesterol ester pada dinding arteri yang dapat mengakibatkan penyakit *arteriosclerosis* dan darah tinggi (Nunes dan Silva, 2009; Gaziano, dkk. 1999; Assmann, 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 pada makanan tradisional secara reguler yang banyak dikonsumsi oleh masyarakat di Indonesia. Instrumen analisis yang sering dipergunakan untuk penentuan kolesterol di dalam makanan dan minuman adalah kolorimetri dan spektrofotometri. Dua metode analisis ini rentan terhadap pengaruh senyawa pengganggu (*interference*), sehingga hasil analisis kurang akurat. Untuk itu diperlukan instrumen analisis yang baik dengan biaya analisis relatif murah, yaitu menggunakan biosensor kolesterol. Tujuan penelitian ini adalah mengembangkan biosensor sebagai instrumen analisis yang sensitif, selektif, akurat, sederhana dan cepat untuk dipergunakan menguji kolesterol di dalam makanan tradisional.

Beberapa metode analisis yang sering dipergunakan untuk menentukan kolesterol diantaranya metode kolorimetri (Park, 1999), 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 (Situmorang, 2010; Martin, dkk. 2003, Singh, dkk, 2004, Brahim, dkk. 2001).

Pengembangan biosensor dengan menggunakan komponen biologi untuk penentuan kolesterol sangat menarik untuk diaplikasikan pada sampel makanan tradisional karena komposisi kolesterol yang terpat di dalam makanan tradisional perlu diketahui untuk memberikan informasi yang tepat terhadap konsumen yang membutuhkan diet kolesterol. Biosensor merupakan instrumen analisis yang baik

karena mempunyai daya analisis selektif dan sensitif terhadap analit sehingga dapat menentukan kadar senyawa pada konsentrasi sangat rendah (Situmorang, dkk. 2007). Penelitian yang dilakukan adalah mengembangkan biosensor sebagai instrumen analisis untuk penentuan kolesterol. Prinsip dasar biosensor kolesterol adalah berdasarkan reaksi enzimasasi pada persamaan reaksi 1-3.



Kolesterol ester diubah 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 (COx). Selanjutnya hidrogen peroksida dioksidasi pada permukaan elektroda karbon gelas terplatinasi menghasilkan arus yang setara dengan konsentrasi kolesterol di dalam sampel makanan tradisional.

METODE PENELITIAN

Zat dan Bahan

Bahan kimia yang dipergunakan adalah senyawa proanalisis (PA) diantaranya kolesterol (99%+), kalium ferrosianida, kalium klorida, isopropanol, Triton X-100, kolesterol oksidase (COx) 33 unit/mg dari *pseudomonash* (E.C.1.1.3.6) diperoleh dari Sigma Chem. Co. Berbagai jenis zat lain diperoleh dari Merk dan BioLab.

Peralatan

Peralatan yang dipergunakan adalah Potentiostat (BAS, USA), elektroda karbon glas (GC) dan Ag/AgCl (BAS) dirangkai dengan mikrokomputer. Peralatan pendukung adalah *water bath thermostat*, dan jarum suntik mikro (Hamilton Co.).

Prosedur Penelitian

Prosedur penelitian meliputi penyediaan larutan, pembuatan biosensor, perlakuan sampel dan analisis menggunakan biosensor kolesterol. Larutan enzim

dibuat dengan cara melarutkannya di dalam air sesuai dengan unit yang dibutuhkan. Teknik pembuatan larutan kolesterol dan larutan buffer untuk reaksi enzimasasi penentuan kolesterol dijelaskan secara terperinci pada studi sebelumnya (Situmorang, dkk., 2007; Situmorang dan Nurwahyuni, 2001; dan Situmorang, dkk. 1998). Pembuatan biosensor kolesterol secara berturut-turut dilakukan dengan cara (1) pembuatan matriks polityramin secara elektrokimia, (2) immobilisasi enzim COx, dan POx pada matriks polityramin, dan (3) integrasi instrumentasi untuk analisis penentuan kolesterol. Prosedur selengkapnya dijelaskan dalam laporan penelitian (Situmorang, dkk., 2011).

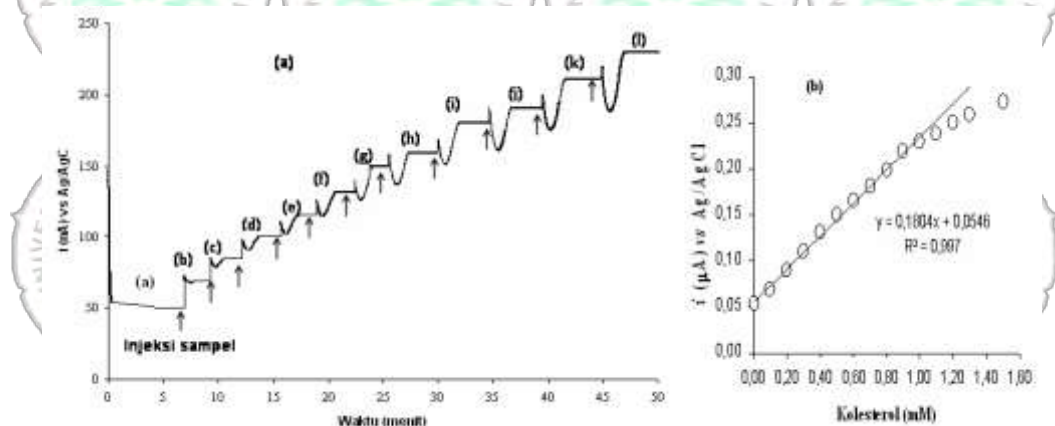
Penentuan kolesterol secara elektrokimia dilakukan menggunakan potensial aplikasi konstan pada 0,6 V vs Ag/AgCl. Larutan standar kolesterol disuntikkan ke dalam larutan buffer (0,01 M, pH 6,0), lalu aduk selama 5 detik, dimatikan, dan respon elektroda yang dihasilkan dalam reaksi enzimasasi diamati. Setelah diperoleh arus yang konstan maka dilakukan penambahan larutan kolesterol standar secara seri, mulai dari konsentrasi yang rendah sampai yang tinggi. Signal arus (i) yang dihasilkan diplot terhadap waktu dan membentuk amperogram untuk pengukuran kolesterol. Penentuan kolesterol di dalam sampel dilakukan menggunakan biosensor dan metode standar spektrofotometri sebagai pembanding.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Respon Biosensor Kolesterol

Biosensor kolesterol yang dikembangkan telah dipergunakan untuk penentuan kolesterol standar, dan bentuk respon biosensor kolesterol diperlihatkan pada Gambar 1a. Biosensor menunjukkan respon yang baik dan sensitif terhadap kolesterol. Signal biosensor (arus, i) yang dihasilkan semakin meningkat setara dengan peningkatan konsentrasi kolesterol yang ditambahkan ke dalam sel elektrokimia. Signal yang dihasilkan dalam biosensor kolesterol masih tergolong kecil (skala nA). Akan tetapi, signal elektroda yang dihasilkan dalam biosensor yang dikembangkan dalam penelitian ini masih lebih baik dari yang dilaporkan Situmorang, (2007) dalam hal stabilitas biosensor. Kurva kalibrasi larutan standar kolesterol (Gambar 1b) menunjukkan linieritas yang baik, yaitu pada skala

konsentrasi 0,01 – 0,1 mM kolesterol, slop 0,180 $\mu\text{A}/\text{mM}$ kolesterol, dan batas deteksi 0,005 mM kolesterol, sehingga dapat diaplikasikan untuk penentuan kolesterol konsentrasi rendah di dalam sampel makanan tradisional.



Gambar 2. (a) Respon biosensor terhadap kolesterol, berturut-turut (a) (0,0 mM, (b) 0,01 mM, (c) 0,1 mM, (d) 0,2 mM, (e) 0,3 mM, (f) 0,4 mM, (g) 0,5 mM, (h) 0,6 mM, (i) 0,7 mM, (j) 0,8 mM, (k) 0,9 mM, dan (l) 1,0 mM kolesterol, dan (b) Kurva kalibrasi larutan kolesterol standar yang dianalisis menggunakan biosensor. Pengukuran 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 5 sweep cycle.

Optimasi Biosensor Kolesterol

Untuk mendapatkan kondisi optimum biosensor maka dilakukan optimasi pada beberapa parameter seperti pengaruh pH larutan buffer, dan pengaruh ketebalan matriks polityramin. Larutan buffer fosfat (0,01 M) yang mengandung elektrolit 1 mM KCl, kemudian pH divariasikan pada kondisi pH fisiologis enzim COx pH 4,5 – 8,0. Respon biosensor pada kondisi pH yang berbeda memberikan sensitivitas pengukuran yang berbeda. Sensitivitas biosensor di dalam larutan buffer fosfat pH 6,0 – 7,0 relatif hampir sama, dan sensitivitas berkurang di dalam larutan buffer pH 4,5 dan pH 8,0. Kondisi terbaik diperoleh pada larutan buffer fosfat 0,01 M pH 6,0, yaitu memberikan sensitivitas yang baik dan memiliki noise yang relatif sangat kecil.

Matriks polimer polityramin diperlukan untuk mengikat enzim secara kovalen karena memiliki gugus amina yang dapat berikatan dengan gugus

karboksil yang terdapat di dalam enzim sehingga stabilitas enzim dapat terjaga dan tidak lepas ke dalam larutan pada saat penggunaan. Pengaruh ketebalan membran polityramin dalam biosensor telah dipelajari melalui variasi elektrodeposisi 1-10 kali. Linearitas dan slop masing-masing biosensor dengan meningkatnya jumlah deposisi secara siklik voltametri dirangkum pada Tabel 1.

Tabel 1. Pengaruh ketebalan membran polityramin terhadap sensitivitas dan linearitas biosensor kolesterol.

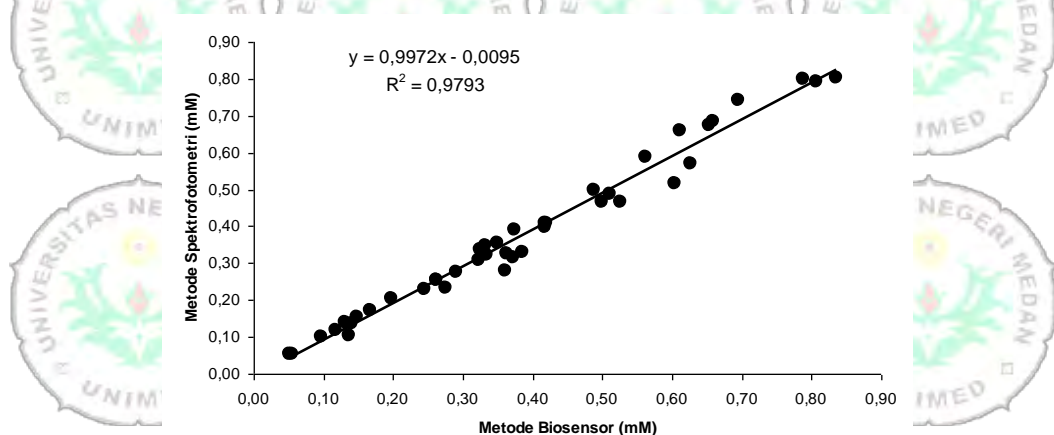
No.	Jumlah Voltamogram CV	Linearitas Deteksi	Slop, ($\mu\text{A}/\text{mM}$)
1	1 kali elektrodeposisi	0,01-0,08 mM kolesterol ($R^2 = 0,9786$)	0,2032
2	3 kali elektrodeposisi	0,01-0,08,0 mM kolesterol ($R^2 = 0,9786$)	0,1903
3	5 kali elektrodeposisi	0,01-1,0 mM kolesterol ($R^2 = 0,9786$)	0,1802
4	7 kali elektrodeposisi	0,01-1,3 mM kolesterol ($R^2 = 0,9954$)	0,1261
5	10 kali elektrodeposisi	0,01-1,5 mM kolesterol ($R^2 = 0,9975$)	0,1043

Semakin banyak polityramin yang dideposit pada permukaan elektroda maka akan semakin lebar skala linearitasnya. Untuk itu diperlukan kompromi antara sensitifitas dan lebarnya skala linearitas maka dipilih elektroda pada biosensor dengan 5 kali elektrodeposisi, sehingga diperoleh $0,180 \mu\text{A}/\text{mM}$. Biosensor dengan yang dibuat dengan 5 kali elektrodeposisi menunjukkan sensitivitas yang baik dan juga membran pada permukaan elektroda sudah memadai untuk menjaga elektroda dari pengaruh senyawa pengganggu (interferen).

Penentuan Kolesterol Dalam Makanan Tradisionil

Biosensor dipergunakan untuk penentuan kolesterol dalam berbagai jenis makanan tradisional Sumatera Utara yang di duga mengandung kolesterol. Makanan tradisionil yang dianalisis adalah jenis makanan yang banyak dikonsumsi masyarakat di berbagai jenis restoran tradisionil di Sumatera Utara. Semua sampel dapat dianalisis menggunakan biosensor dan metode standar spektrofotometri UV-Vis. Kadar kolesterol di dalam sampel berada pada skala $0,051 \text{ mM} - 0,835 \text{ mM}$ kolesterol. Penentuan kolesterol menggunakan biosensor menunjukkan hasil yang baik, yaitu temuan kadar kolesterol di dalam sampel hampir sama dengan kadar kolesterol di dalam sampel menggunakan metode spektrofotometri (93-130%). Untuk beberapa sampel, hasil analisis biosensor lebih tinggi di banding dengan metode standar, kemungkinan disebabkan oleh

keakuratan analisis menggunakan metode biosensor lebih baik dibanding metode spektrofotometri, terutama pada sampel yang memiliki warna khas yang mempengaruhi pengukuran spektrofotometri sehingga penentuan kolesterol menjadi kurang akurat. Hasil analisis kolesterol menggunakan biosensor sangat selektif sehingga kehadiran senyawa pewarna yang terdapat pada makanan tradisional tidak mempengaruhi hasil pengukuran. Perbandingan hasil analisis untuk kedua metode analisis diperlihatkan pada Gambar 2, yaitu hasil analisis dua jenis metode sangat identik ($R^2 = 0,979$).



Gambar 2. Hasil analisis kadar kolesterol di dalam sampel makanan tradisional ditentukan dengan menggunakan Metode Biosensor dan Metode Spektrofotometri secara reaksi enzimasi. Hasil adalah dari rata-rata 2 kali pengukuran.

Metode analisis biosensor memiliki sensitifitas tinggi, yaitu dapat menentukan kolesterol di dalam sampel pada konsentrasi 0,01 mM kolesterol, sehingga tidak diperlukan prekonsentrasi sampel pada sampel makanan dan minuman yang mengandung kadar kolesterol rendah. Metode Biosensor juga mempunyai kecepatan analisis tinggi, hanya membutuhkan 1 menit untuk menentukan kadar kolesterol di dalam satu sampel setelah perlakuan.

KESIMPULAN

Biosensor kolesterol memberikan respon baik terhadap kolesterol, linearitas pengukuran berada pada skala konsentrasi 0,01–1,0 mM kolesterol, slop 0,180 $\mu\text{A}/\text{mM}$ kolesterol, dan batas deteksi 0,01 mM kolesterol. Biosensor telah diaplikasikan untuk penentuan kolesterol di dalam berbagai jenis makanan

tradisionil Sumatera Utara. Kadar kolesterol yang terdapat di dalam makanan tradisionil berada pada skala 0,051 mM-0,835 mM kolesterol.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih disampaikan kepada Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi, Kementerian Pendidikan Nasional yang memberikan dana penelitian, sesuai dengan Surat Perjanjian Hibah Penugasan Penelitian Strategis Nasional Nomor: 423/SP2H/PL/ Dit.Litabnas/IV/2011, Tanggal 4 April 2011.

DAFTAR PUSTAKA

- Amundson, D.M. dan Zhou, M.J., (1999), Fluorometric method for the enzymatic determination of cholesterol, *Journal of Biochemical Biophysical Method* **38**: 43-52.
- Assmann, G.; Cullen, P.; Jossa, F.; Lewis, B. dan Mancini, M., (1999), Coronary heart disease: Reducing the risk - The scientific background to primary and secondary prevention of coronary heart disease a worldwide view, *Arteriosclerosis Trombosis and Vascular Biology* **19**: 1819-1824.
- Botsoglou, N.; Fletouris, D.; Psomas, I. dan Mantis, A., (1998), Rapid gas chromatographic method for simultaneous determination of cholesterol and alpha-tocopherol in eggs, *Journal of AOAC International* **81**: 1177-1183.
- Brahim, S.; Narinesingh, D. dan Guiseppi-Elie, A., (2001), Amperometric determination of cholesterol in serum using a biosensor of cholesterol oxidase contained within a polypyrrole-hydrogel membrane, *Analytica Chimica Acta* **448(1-2)**: 27-36.
- Emara, S.; Hussien, S.A. dan Mohamed, F.A., (1999), Determination of cholesterol in egg yolk by high performance liquid chromatography using an automated precolumn-switching procedure, *Journal of Liquid Chromatography Related Technologies* **22**: 1235-1246.
- Gaziano, J.M.; Sesso, H.D.; Breslow, J.L.; Hennekens, C.H. dan Buring, J.E., (1999), Relation between systemic hypertension and blood lipids on the risk of myocardial infarction, *American Journal of Cardiology* **84**: 768-773.
- Martin, S.P.; Lamb, D.J.; Lynch, J.M. dan Reddy, S.M., (2003), Enzyme-based determination of cholesterol using the quartz crystal acoustic wave sensor, *Analytica Chimica Acta* **487(1)**: 91-100.
- Nunes, J.P.L. dan Silva, J.C., (2009), Systemic Correlates of Angiographic Coronary Artery Disease, *PLoS ONE* **4(1)**: e4322
- Park, Y.W., (1999), Cholesterol contents of US and imported goat milk cheeses as quantified by different colorimetric methods, *Small Ruminant Research* **32**: 77-82

- Singh, S.; Chaubey, A. dan Malhotra, B.D., (2004), Amperometric cholesterol biosensor based on immobilized cholesterol esterase and cholesterol oxidase on conducting polypyrrole films, *Analytica Chimica Acta* **502(2)**: 229-234.
- Situmorang, M. dan Nurwahyuni, I., (2001), Immobilisasi enzim dalam reaktor untuk penentuan kolesterol serum, *Majalah Kedokteran Nusantara* **34**: 84-89
- Situmorang, M., (2010), Pengembangan Biosensor Untuk Menguji Kualitas Makanan Dan Minuman, *Seminar Nasional dan Rapat Tahunan (SEMIRATA 2010), di Pekanbaru*
- 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
- Situmorang, M.; Silitonga, P.M.; Nurwahyuni, I., (2011), *Pengembangan Biosensor Sebagai Instrumen Analisis Untuk Menguji Kualitas Makanan Dan Minuman*, Laporan Penelitian, FMIPA Universitas Negeri Medan.
- 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 di Dalam Makanan dan Minuman, *Jurnal Sain Indonesia* **30(4)**: 125-130.
- Sniderman, A.D. dan Cianflone, K., (1999), Lipids and vascular disease: what we do and do not know, *Clinica Chimica Acta* **286**: 7-22.

