



TESIS - SK092402

**MODIFIKASI ELEKTRODA KERJA EMAS
DENGAN POLIANILIN-ENZIM INVERTASE-
PARTIKEL NANO EMAS SEBAGAI
BIOSENSOR SUKROSA**

FITRIYANA
1410 201 004

DOSEN PEMBIMBING
Dr. rer. nat. Fredy Kurniawan, M.Si

PROGRAM MAGISTER
BIDANG KEAHLIAN KIMIA HAYATI
JURUSAN KIMIA
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
INSTITUT TEKNOLOGI SEPULUH NOPEMBER
SURABAYA
2014



TESIS - SK092402

SUCROSE DETECTION USING POLYANILINE -INVERTASE - GOLD NANOPARTICLES MODIFIED GOLD ELECTRODE

FITRIYANA
1410 201 004

Supervisor
Dr. rer. nat. Fredy Kurniawan, M.Si

MASTER PROGRAM
CHEMISTRY DEPARTMENT
FACULTY OF MATHEMATICS AND NATURAL SCIENCES
INSTITUT TEKNOLOGI SEPULUH NOPEMBER
SURABAYA
2014

**MODIFIKASI ELEKTRODA KERJA EMAS
DENGAN POLIANILIN-ENZIM INVERTASE-PARTIKEL NANO EMAS
SEBAGAI BIOSENSOR SUKROSA**

Nama mahasiswa : Fitriyana
NRP : 1410 201 004
Pembimbing : Dr.rer.nat. Fredy Kurniawan, M.Si

ABSTRAK

Elektroda kerja emas telah dimodifikasi dengan polianilin, enzim invertase dan partikel nano emas dan diujikan pada larutan sukrosa. Modifikasi elektroda emas dengan polianilin (PANI) dan enzim invertase dilakukan dengan teknik voltametri siklik menggunakan potensiostat, sedangkan pengendapan partikel nano emas pada permukaannya dilakukan dengan teknik lapis demi lapis. Permukaan elektroda termodifikasi diamati perubahannya menggunakan mikroskop optik. Elektroda termodifikasi kemudian digunakan untuk mendeteksi sukrosa dengan teknik voltametri siklik dalam larutan buffer fosfat pada pH 6,78. Respon arus oksidasi pada potensial 328 mV merupakan arus oksidasi glukosa sebagai hasil hidrolisis sukrosa, sehingga elektroda modifikasi memberikan respon terhadap sukrosa dan glukosa dengan $k_{i,j}^{amp} = 0,174$. Nilai arus oksidasi naik seiring dengan naiknya konsentrasi sukrosa hingga sinyal arus yang dihasilkan menjadi konstan pada konsentrasi sukrosa 45 hingga 50 mM. Kurva kalibrasi yang dihasilkan adalah kurva hiperbolik khas enzim $R = 0,9983$. Hasil perhitungan menunjukkan bahwa sensitivitas elektroda emas termodifikasi polianilin, enzim invertase dan partikel nano emas sebesar $0,4657 \mu\text{A} \cdot \text{mm}^{-2} \cdot \text{mM}^{-1}$ dengan limit deteksi sebesar $9 \mu\text{M}$.

Kata kunci : Biosensor sukrosa, PANI, invertase, partikel nano emas, voltametri siklik.

”Halaman ini sengaja dikosongkan”

SUCROSE DETECTION USING POLYANILINE – INVERTASE – GOLD NANOPARTICLES MODIFIED GOLD ELECTRODE

By : Fitriyana
Student Identity Number : 1410 201 004
Supervisor : Dr.rer.nat. Fredy Kurniawan, M.Si

ABSTRACT

A modified working electrode fabricated with polyaniline, the enzyme invertase and gold nano particles has been successfully tested to sucrose solution. The modification was performed through cyclic voltammetry technique by using potentiostat. Gold nano particles were coated to the electrode surface layer by layer and simultaneously observed the gradation of surface formation using optical microscope. Sucrose was tested in buffer phospat solution with acidity level at 6.78. The potential current oxidation respond at 328 mV was identified as current oxidation of glucose yielded from hidrolisis process of sucrose. Selectivity coefficient of this modified electrode to glucose was $k_{i,j}^{amp} = 0,174$. The oxidation current and sucrose concentration showed a positive linear relationship but limited to maximum 45-50 mM of sucrose concentration. Experimental callibration curve which figure out electrode respond to different sucrose concentration followed a typical enzyme hyperbolic trend line with $R = 0,9983$. Therefore, it suggested that the new modified working electrode has sensitivity to the sucrose at $0,4657 \mu A \cdot mm^{-2} \cdot mM^{-1}$ with limit detection at 9 μM .

Keyword : Sucrose biosensor, PANI, invertase, gold nanoparticles, cyclic voltammetry.

”Halaman ini sengaja dikosongkan”

LEMBAR PENGESAHAN TESIS

Tesis ini disusun untuk memenuhi salah satu syarat memperoleh gelar
Magister Sains (M.Si)

Di

Institut Teknologi Sepuluh Nopember Surabaya

Oleh:

FITRIYANA

NRP. 1410 201 004

Tanggal Ujian : 30 Januari 2014

Periode Wisuda : Maret

Disetujui Oleh:

1. **Dr. Rer. nat. Fredy Kurniawan** (Pembimbing)
NIP. 19740428 199802 1 001
2. **Suprpto, M.Si., Ph.D.** (Penguji)
NIP. 19720919 199802 1 001
3. **Dr. Didik Prasetyoko, M.Sc.** (Penguji)
NIP. 19710616 199703 1 002
4. **Prof. Dr. R. Y. Perry Burhan, M.Sc.** (Penguji)
NIP. 19590215 198701 1 001

Direktur Program Pascasarjana

Prof. Dr. Ir. Adi Soeprijanto, MT.

NIP. 19640405 1999002 1 001

KATA PENGANTAR

Alhamdulillah puji syukur kehadirat Allah SWT yang telah memberikan kemampuan dan kesempatan kepada penulis untuk menyelesaikan tesis yang berjudul **“Modifikasi Elektroda Kerja Emas dengan Polianilin – Enzim Invertase – Partikel Nano Emas Sebagai Biosensor Sukrosa.”**

Penulis mengucapkan terima kasih kepada semua pihak yang telah memberikan dukungan dan bantuan dalam penyusunan Tesis ini. Ucapan tersebut terutama disampaikan kepada:

1. Dr. rer. nat. Fredy Kurniawan, M.Si selaku dosen pembimbing dan dosen wali yang dengan sabar berkenan memberikan nasehat, bimbingan dan saran.
2. Prof. Mardi Santoso, Ph.D selaku Kaprodi Magister Kimia ITS.
3. Bapak Hamzah Fansuri, Ph.D selaku Ketua Jurusan Kimia FMIPA-ITS.
4. Seluruh dosen dan karyawan Jurusan Kimia, FMIPA-ITS.
5. Kedua orang tua, suami dan anak-anak tercinta yang selalu memberikan dukungan dan do'a.
6. Teman-teman Program Pascasarjana Kimia angkatan 2010 - 2011 dan semua pihak yang telah berpartisipasi dalam penyelesaian tesis ini.

Kritik dan saran yang membangun dari semua pihak sangat penulis harapkan demi kesempurnaan tesis ini. Semoga naskah tesis ini bisa memberikan manfaat.

Surabaya, Januari 2014

Penulis

”Halaman ini sengaja dikosongkan”

DAFTAR ISI

	Hal.
HALAMAN JUDUL	i
LEMBAR PENGESAHAN	iii
ABSTRAK	v
ABSTRACT	vii
KATA PENGANTAR	ix
DAFTAR ISI	xi
DAFTAR GAMBAR	xiii
DAFTAR TABEL	xvii
DAFTAR LAMPIRAN	xix
BAB 1 PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Perumusan Masalah.....	4
1.3 Tujuan dan Manfaat Penelitian	5
BAB 2 KAJIAN PUSTAKA DAN DASAR TEORI	7
2.1 Polimer konduktif.....	7
2.2 Polianilin (PANI)	8
2.3 Partikel Nano Emas	11
2.4 Enzim Invertase	12
2.5 Amobilisasi Enzim Invertase	13
2.6 Biosensor	15
2.7 Biosensor Sukrosa	17
BAB 3 METODA PENELITIAN	19
3.1 Peralatan dan Bahan.....	19
3.1.1 Peralatan	19
3.1.2 Bahan	19
3.2 Prosedur Kerja	19
3.2.1 Pemurnian Anilin	19
3.2.2 Ekstraksi Enzim Invertase dari Ragi Roti	19
3.2.3 Preparasi Elektroda Emas	20
3.2.4 Sintesis Partikel Nano Emas	20

3.2.5	Modifikasi Elektroda Emas dengan Polianilin, Enzim Invertase dan Partikel nano emas	20
3.2.6	Deteksi Sukrosa	21
BAB 4	HASIL DAN PEMBAHASAN	23
4.1	Elektroda Emas	23
4.2	Modifikasi Elektroda Emas	24
4.2.1	Modifikasi Elektroda Emas dengan Polianilin (PANI)	24
4.2.2	Modifikasi Elektroda Emas dengan PANI dan Invertase	26
4.2.3	Modifikasi Elektroda Emas dengan PANI, Invertase dan Partikel Nano Emas	30
4.3	Penentuan pH Optimum Larutan Uji terhadap Kinerja Elektroda Emas Termodifikasi PANI, Invetase dan Partikel Nano Emas	32
4.4	Penentuan Limit Deteksi dan Sensitivitas Elektroda terhadap Sukrosa	38
4.5	Penentuan Selektivitas Elektroda Emas Termodifikasi PANI, Invertsase dan Partikel Nano Emas terhadap Fruktosa, Glukosa dan Sukrosa.....	42
BAB 5	KESIMPULAN	45
	DAFTAR PUSTAKA.....	47
	LAMPIRAN.....	51

DAFTAR GAMBAR

Nomor	Judul	Halaman
2.1	Polimer Konduktif	7
2.2	Polianilin Teroksidasi dan Tereduksi	9
2.3	Voltamogram Polianilin dalam HCl pada Permukaan <i>Indium Tin Oxide</i> (ITO)	9
2.4	Pengikatan Substrat oleh Enzim Invertase	13
2.5	Aktivitas Enzim Invertase Bebas dan Amobil pada Variasi pH dan Temperatur	15
2.6	Perangkat Umum Biosensor	15
2.7	Generasi dari Biosensor	16
4.1	Elektroda emas sebelum dibungkus isolasi bakar (a), Elektroda emas setelah dibungkus isolasi bakar (b), Foto permukaan elektroda emas menggunakan mikroskop optik (c)	23
4.2	Voltammogram respon elektroda emas terhadap sukrosa 100 mM dalam buffer pH 6,78 dengan scan rate 100 mV/s	24
4.3	Voltammogram polimerisasi anilin pada permukaan elektroda emas dengan scan rate 50 mV/s	25
4.4	Foto permukaan elektroda kerja emas sebelum modifikasi (a), sesudah termodifikasi dengan PANI (b)	27
4.5	Voltammogram respon elektroda emas termodifikasi PANI terhadap sukrosa 100 mM dalam buffer pH 6,78 dengan scan rate 100 mV/s	28
4.6	Voltammogram penjebakan enzim invertase pada permukaan elektroda emas termodifikasi PANI	29
4.7	Foto permukaan elektroda kerja emas (a) sebelum termodifikasi, sesudah termodifikasi dengan: (b) PANI; (c) PANI dan enzim invertase	29
4.8	Voltammogram respon elektroda emas termodifikasi PANI, invertase terhadap sukrosa 100 mM dalam buffer pH 6,78 dengan scan rate 100 mV/s	30
4.9	Foto permukaan elektroda kerja emas (a) sebelum modifikasi, sesudah modifikasi dengan : (b) PANI; (c)	31

	PANI dan enzim invertase; PANI, enzim invertase dan partikel nano emas dengan perendaman (d) 15 menit; (e) 30 menit; (f) 24 jam	
4.10	Voltammogram respon elektroda emas termodifikasi PANI, invertase dan partikel nano emas terhadap sukrosa 100 mM dalam buffer pH 6,78 dengan scan rate 100 mV/s	32
4.11	Voltammogram respon elektroda emas termodifikasi PANI, invertase dan partikel nano emas terhadap sukrosa 100 mM dalam buffer pH 3,18 dengan scan rate 100 mV/s	33
4.12	Voltammogram respon elektroda emas termodifikasi PANI, invertase dan partikel nano emas terhadap sukrosa 100 mM dalam buffer pH 5,27 dengan scan rate 100 mV/s	34
4.13	Voltammogram Respon Elektroda Emas termodifikasi PANI, Invertase dan Partikel nano emas terhadap Sukrosa 100 mM dalam Buffer pH 6,14 dengan scan rate 100 mV/s	34
4.14	Voltammogram respon elektroda emas termodifikasi PANI, invertase dan partikel nano emas terhadap sukrosa 100 mM dalam buffer pH 6,78 dengan scan rate 100 mV/s	35
4.15	Voltammogram respon elektroda emas termodifikasi PANI, invertase dan partikel nano emas terhadap sukrosa 100 mM dalam buffer pH 7,05 dengan scan rate 100 mV/s	35
4.16	Voltammogram respon elektroda emas termodifikasi PANI, invertase dan partikel nano emas terhadap sukrosa 100 mM dalam buffer pH 7,89 dengan scan rate 100 mV/s	36
4.17	Voltammogram respon elektroda emas termodifikasi PANI, invertase dan partikel nano emas terhadap sukrosa 100 mM dalam buffer pH 8,47 dengan scan rate 100 mV/s	36
4.18	Voltammogram respon elektroda emas termodifikasi PANI, invertase dan partikel nano emas terhadap sukrosa 100 mM dalam buffer pH 10,76 dengan scan rate 100 mV/s	37
4.19	Voltammogram respon elektroda emas termodifikasi PANI, invertase dan partikel nano emas terhadap	37

	sukrosa 100 mM dalam buffer pH 11,36 dengan scan rate 100 mV/s	
4.20	Voltammogram respon elektroda emas termodifikasi PANI, invertase dan partikel nano emas terhadap larutan sukrosa 0 – 50 M dalam buffer pH 6,78 dengan scan rate 100 mV/s	38
4.21	Voltammogram selisih respon elektroda emas termodifikasi PANI, invertase dan partikel nano emas terhadap larutan sukrosa 1 – 50 M dan blanko pada pH 6,78 di daerah 275 – 400 mV dengan scan rate 100 mV/s	39
4.22	Kurva respon arus elektroda emas termodifikasi PANI, invertase dan partikel nano emas terhadap deret larutan sukrosa dalam buffer pH 6,78 dengan scan rate 100 mV/s pada potensial 328 mV	40
4.23	Kurva kalibrasi konsentrasi sukrosa terhadap respon arus elektroda emas termodifikasi PANI, invertase dan partikel nano emas	40
4.24	Kurva Linier Konsentrasi Sukrosa terhadap Respon Arus Elektroda emas termodifikasi PANI, invertase dan partikel nano emas	41
4.25	Voltammogram respon elektroda emas termodifikasi PANI, invertase dan partikel nano emas terhadap sukrosa, fruktosa dan glukosa 100 mM dalam buffer pH 6,78 dengan scan rate 100 mV/s	43

"Halaman ini sengaja dikosongkan"

DAFTAR TABEL

Nomor	Judul	Halaman
2.1	Pengaruh Konsentrasi Na-Sitrat pada Ukuran Partikel Nano Emas	11
2.2	Aktivitas Enzim Invertase Amobil Selama Penyimpanan dalam Pelarut	15
4.1	Tabel Data Pengukuran Elektroda Modifikasi terhadap Blanko	42
4.2	Koefisien Selektivitas Elektroda Emas Termodifikasi PANI, Invertase dan Partikel nano emas	44

"Halaman ini sengaja dikosongkan"

BAB 1

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Gula merupakan salah satu bahan pemanis yang umumnya digunakan dalam makanan maupun minuman. Konsumsi gula di dunia pada tahun 2008 sebesar 163 juta ton, 70% diantaranya diproduksi dari tebu (*Saccharum* sp) dan sisanya dari bit (Departemen Perindustrian, 2009). Industri gula di Indonesia pada umumnya berbasis kepada pengolahan gula dari bahan baku tebu. Proses produksi gula tebu yaitu memisahkan sukrosa dari batang tebu dan mengolahnya menjadi kristal gula. Mutu gula pada dasarnya tergantung pada dua faktor yaitu kandungan gula dalam batang tebu dan pengolahan nira tebu menjadi gula. Oleh karena itu proses ini tidak lepas dari kegiatan usaha tani tebu dan pengolahannya oleh pabrik gula.

Tebu yang diserahkan ke pabrik gula harus mempunyai kualitas tertentu yang diukur dan ditetapkan sebagai standar harga tebu atau pendapatan petani. Karena tebu yang dihasilkan petani tidak secara langsung dijual ke pihak pabrik gula untuk diolah menjadi gula sehingga kualitas tebu ditentukan dengan perhitungan rendemen nilai nira perahan pertama (NNPP). Nilai nira perahan pertama merupakan ukuran kualitas nira yang diambil dari gilingan pertama dan dihitung berdasarkan perhitungan Brix dan Pol. Brix menyatakan persen berat zat padat terlarut dalam larutan. Apabila larutannya adalah sukrosa murni, maka Brix sama dengan persen sukrosa. Akan tetapi bila tidak murni, maka Brix merupakan nilai dari sukrosa dan zat padat terlarut lainnya. Sedangkan Pol menunjukkan konsentrasi larutan sukrosa dalam air. Jika larutan sukrosa murni, maka Pol adalah konsentrasi sukrosa, tetapi untuk larutan yang terdiri dari sukrosa dan zat-zat optik lain, maka Pol menunjukkan jumlah rotasi zat-zat penyusunnya. Oleh karena itu pengukuran kualitas tebu dari perhitungan NNPP menggunakan metode Brix dan Pol menjadi tidak akurat (Lembaga Riset Perkebunan Indonesia, 2004).

Metode untuk analisa gula lainnya yang lebih akurat yaitu *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC). Akan tetapi metode ini memiliki beberapa kelemahan, antara lain memerlukan alat yang mahal dengan penanganan khusus, seperti pengaturan parameter pada HPLC: kolom, jenis fasa gerak *grade* HPLC, laju alir, volume injeksi, detektor, *recorder* dan waktu operasi. Sampel gula juga harus melalui tahap persiapan awal agar hasilnya tidak dipengaruhi oleh adanya campuran senyawa lain (Barlikova et al., 1991). Selain itu metode pengukuran gula menggunakan HPLC lambat, kurang sensitif, efisiensi terhadap pemisahan glukosa dan fruktosa rendah (Farine et al., 1997).

Beberapa metode untuk penentuan sukrosa telah diusulkan menggunakan teknik termometri (Thavarungkul et al., 1999), konduktometri (Soldatkin et al., 2008), potensiometri oksigen (Rotariu et al., 2002) dan spektrofotometri (Mattos et al., 1988) akan tetapi metode-metode tersebut memerlukan waktu yang lama dan tidak selektif. Oleh karena itu, pengembangan metode penentuan sukrosa yang cepat, murah, selektif dan sensitif terus berlangsung hingga sekarang.

Penentuan kadar sukrosa yang lebih akurat telah banyak berkembang. Salah satu metode penentuan sukrosa yaitu biosensor berbasis elektrokimia karena metoda ini dianggap sebagai perangkat instrumen analisis yang akurat, sensitif, selektif, cepat, sederhana dan dengan biaya analisis relatif murah (Kerman et al., 2004). Bisenberger et al. (1995) dan Gülce et al. (1995) menentukan sukrosa berbasis elektrokimia (amperometri).

Biosensor berbasis elektrokimia untuk penentuan sukrosa umumnya menggunakan elektroda kerja enzim. Ada beberapa keuntungan dari penggunaan elektroda kerja berbasis enzim, seperti penentuan analit secara mudah dalam campuran yang kompleks, penggunaan volume sampel yang kecil dan penggunaan enzim secara berulang kali.

Sukrosa merupakan suatu disakarida yang terdiri unit glukosa dan fruktosa yang terhubung melalui ikatan glikosida. Hidrolisis akan memecah ikatan glikosida, dan mengubah sukrosa menjadi glukosa dan fruktosa. Akan tetapi proses hidrolisis sukrosa merupakan reaksi kimia yang tidak menghasilkan energi listrik yang diperlukan dalam biosensor berbasis elektrokimia, sehingga

perkembangan elektroda enzim untuk sukrosa pada umumnya terdiri atas tiga enzim, antara lain enzim Invertase, mutarotase dan glukosa oksidase yang diamobilisasi pada permukaan elektroda (Klinchan et al., 2002).

Ada beberapa permasalahan yang timbul pada fabrikasi elektroda yang menggunakan tiga jenis enzim. Permasalahan tersebut antara lain: pertama, setiap enzim dikenal memiliki pH optimal, yang dapat bergeser ke wilayah baik basa atau asam sebagai hasil dari imobilisasi (Soldatkin et al., 2008), karena campuran tiga enzim yang berbeda, maka pH optimum pada permukaan biosensor berubah-ubah, akibatnya penentuan pH optimal buffer untuk kerja biosensor menjadi sulit. Kedua, hasil hidrolisis sukrosa oleh enzim invertase merupakan campuran ekimolar dari α -D-glukosa β -D-fruktosa, sedangkan enzim mutarotase digunakan untuk mengubah α -glukosa menjadi β -glukosa. Akan tetapi keberadaan hidrogen peroksida yang dihasilkan dari hidrolisis glukosa oleh glukosa oksidase menyebabkan penurunan aktivitas mutarotase (oksidasi mutarotase oleh peroksida) (Scheller et al., dalam Soldatkin et al., 2008). Ketiga, penambahan glukosa oksidase sebagai salah satu komponen penyusun elektroda enzim biosensor sukrosa menyebabkan elektroda memberikan respon yang lebih besar terhadap glukosa lebih besar dibandingkan dengan sukrosa pada konsentrasi yang sama (Barlikova et al., 1991; Soldatkin et al., 2008).

Biosensor yang efektif dan selektif masih terus dikembangkan. Salah satunya memodifikasi elektroda kerja. Modifikasi elektroda kerja dengan satu jenis enzim saja yaitu invertase yang tentunya lebih sederhana dibanding elektroda enzim pada umumnya yang menggunakan lebih dari satu jenis enzim. Fabrikasi biosensor sukrosa yang akan dilakukan ini adalah dengan memodifikasi elektroda kerja emas dengan polianilin (PANI), enzim invertase dan partikel nano emas. Penggunaan emas sebagai elektroda kerja pada sensor sukrosa disebabkan oleh respon arus oksidasi yang diberikan sukrosa sepuluh kali lebih besar dibandingkan respon sukrosa terhadap logam platina (Parpot et al., 1993).

Polianilin (PANI) merupakan salah satu polimer konduktif yang dipertimbangkan sebagai media elektron dan matrik enzim. Pori-pori PANI yang berukuran nano memberikan luas permukaan yang memungkinkan untuk bereaksi

lebih cepat dengan senyawa lain (Virji, 2004). Dalam aplikasinya PANI sangat menjanjikan karena mudah disintesis, monomernya murah dan memiliki kestabilan konduktivitas yang lebih baik dibandingkan polimer konduktif yang lain seperti polipirol (PPy), politiofena dan poli (p-fenilena) (Bhadra, 2009). Polianilin dapat disintesis menggunakan metode elektrokimia pada potensial -500 hingga +1000 mV terhadap elektroda Ag/AgCl (Wang, 1987).

Pada pembuatan biosensor ini digunakan partikel nano emas. Partikel nano emas dapat menjebak biomolekul sehingga mampu mempertahankan bioaktivitasnya. Keuntungan ini menyebabkan nano partikel emas sering digunakan untuk penyusunan biosensor. Selain itu, partikel nano emas juga memungkinkan transfer elektron langsung antara protein dengan elektroda yang berguna sebagai elektro katalis proses redoks dalam reaksi biokimia. Partikel nano emas telah berhasil digunakan untuk memodifikasi permukaan elektroda, karena modifikasi pada elektroda dengan partikel nano emas memungkinkan perluasan permukaan aktif untuk imobilisasi biomolekul seperti enzim serta memfasilitasi aliran elektron antara permukaan padat dan biomolekul. Dengan demikian, batas deteksi yang lebih baik diperoleh dibandingkan dengan biosensor tanpa modifikasi nanopartikel (Kurniawan et al., 2006 ; Kerman et al., 2008 dan Ozdemir et al., 2010).

1.2 Perumusan Masalah

Perkembangan biosensor sukrosa pada umumnya terdiri atas tiga enzim, antara lain enzim invertase, mutarotase dan glukosa oksidase yang diamobilisasi pada permukaan elektroda. Permasalahan yang timbul dari penggunaan tiga macam enzim pada elektroda tersebut yaitu memerlukan pH optimum untuk kerja masing-masing enzimnya. Oleh karena itu penelitian ini dilakukan untuk menguji efektivitas biosensor sukrosa menggunakan satu macam enzim, yaitu enzim invertase yang diamobilisasi pada elektroda termodifikasi.

1.3 Tujuan dan Manfaat Penelitian

Tujuan penelitian :

1. Modifikasi elektroda emas/polianilin/enzim invertase/partikel nano emas.
2. Mengetahui respon elektroda terhadap sukrosa.
3. Menentukan limit deteksi dan sensitivitas elektroda terhadap sukrosa.
4. Menentukan selektivitas elektroda.

Manfaat penelitian ini adalah sebagai alat bantu untuk mendeteksi berbagai bahan yang mengandung gula khususnya sukrosa. Dalam skala yang lebih operasional, biosensor ini dapat membantu mengukur kualitas tebu petani untuk penentuan standar harga jual ke pabrik gula. Metode ini diharapkan menjadi metode yang handal dan tepat guna untuk menggantikan metode polarimeter yang selama ini digunakan untuk mengukur kualitas tebu petani guna penentuan standar harga jual ke pabrik gula. Selain itu dapat memberikan kontribusi pengembangan ilmu pengetahuan khususnya pada bahasan pengembangan sensor secara elektrokimia.

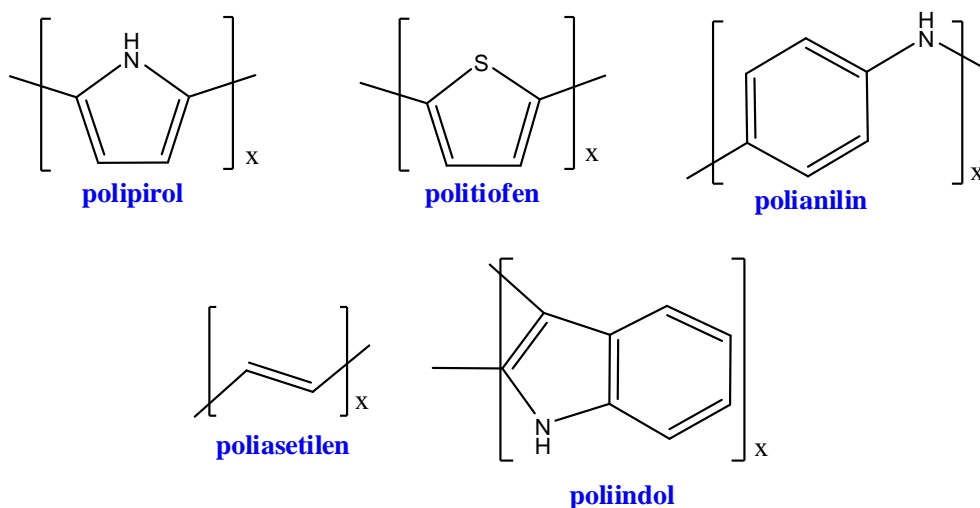
"Halaman ini sengaja dikosongkan"

BAB 2

KAJIAN PUSTAKA DAN DASAR TEORI

2.1 Polimer konduktif

Polimer konduktif adalah polimer yang mengandung perpanjangan rantai π terkonjugasi, sehingga elektronnya terdelokalisasi. Konduktivitas elektronik polimer konduktif yaitu $10^{-14} - 10^2 \text{ S.cm}^{-1}$ (Ahuja et al., 2007). Polimer konduktif mempunyai sifat reversibel redoks, dimana sifat pada tiap kondisi tereduksi maupun teroksidasi dapat dibedakan. Sifat ini menjadi menarik untuk dijadikan sebagai material baru pembuatan sensor kimia. Beberapa contoh polimer konduktif yaitu :



Gambar 2.1 Polimer Konduktif

Polimer konduktif dapat disintesis baik secara kimia maupun elektrokimia. Sintesis polimer secara elektrokimia atau elektro polimerisasi lebih disukai karena menghasilkan *film* polimer pada permukaan anoda dan dapat dilepas sebagai polimer bebas, selain itu elektro polimerisasi dapat dilakukan pada suhu kamar (Gerard et al., 2002). Elektro polimerisasi dapat dilakukan dalam suatu wadah yang berisi monomer dan elektrolit dengan konfigurasi tiga elektroda. Untuk memperoleh *film* polimer maka polimerisasi dilakukan secara potentiostatik

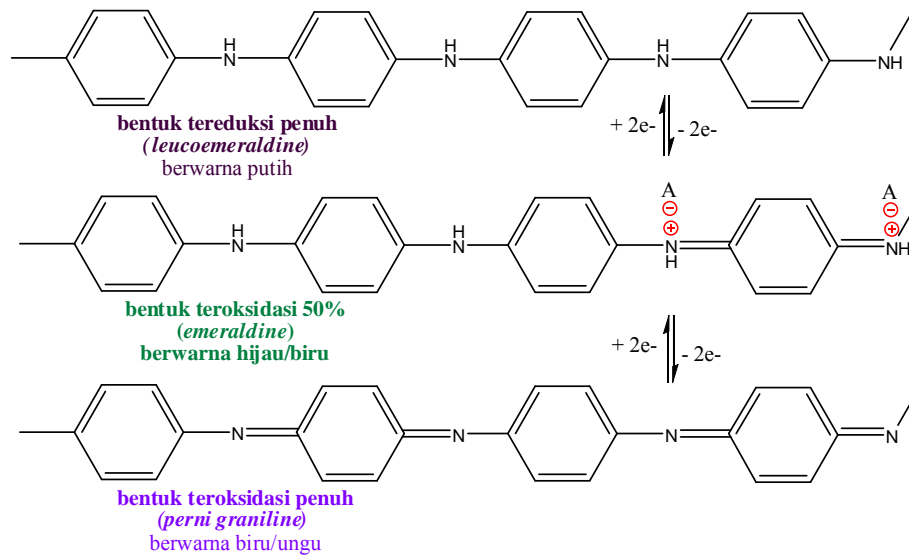
sedangkan untuk mendapatkan polimer tebal digunakan galvanostatis (Ahuja et al., 2007).

Sistem tiga-elektroda standar yang digunakan terdiri dari elektroda kerja, elektroda bantu dan elektroda pembanding. Fungsi elektroda kerja adalah untuk mendukung film polimer. Elektroda kerja yang sering digunakan antara lain emas, karbon, nikel, paladium, platina dan titanium. Selain itu, kaca yang dilapisi dengan oksida indium timah juga dapat digunakan sebagai elektroda kerja. Elektroda bantu berfungsi untuk menyuplai arus yang diperlukan oleh elektroda kerja. Contoh elektroda bantu yaitu logam emas, nikel dan platina. Elektroda pembanding yang umumnya digunakan adalah *Saturated Calomel Electrode* (SCE).

2.2 Polianilin (PANI)

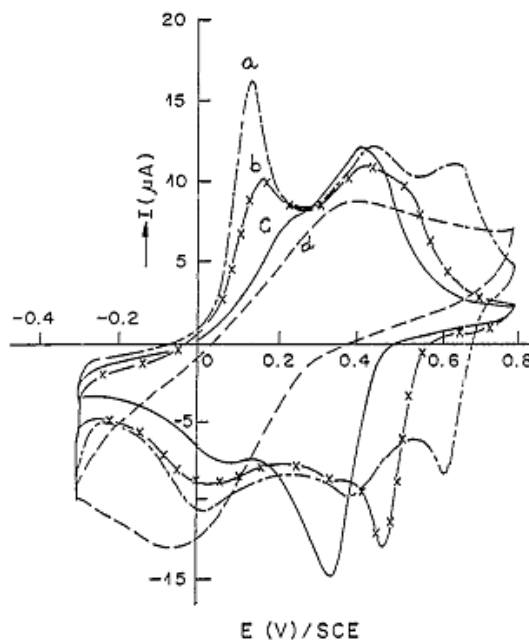
Polimer konduktif yang sering disintesis adalah PANI. Keunggulan PANI dibanding polimer konduktif lain di antara adalah: stabil pada suhu tinggi (250 – 350°C), serta dalam kondisi asam maupun basa (Brožová et al., 2008), konduktivitas baik pada temperature kamar yaitu sebesar $37 \times 10^{-2} \text{ Scm}^{-1}$ (Youssef et al., 2012), reversibel redoks, mudah dipolimerisasi dalam media air dengan metode sintesis yang sederhana. Dari sudut pandang ekonomi, monomer anilin secara signifikan lebih murah dibandingkan monomer lain (Bhadra et al., 2009). Polianilin dapat digunakan sebagai media elektron dan matrik enzim, karena pori-pori PANI yang berukuran nano memberikan luas permukaan yang memungkinkan untuk bereaksi lebih cepat dengan senyawa lain (Virji, 2004).

Polianilin merupakan polimer yang dihasilkan dari pengulangan reduksi (B-NH-B-NH) dan oksidasi (B-N - Q = N-). Huruf B menunjukkan benzenoid dan Q menandakan cincin quinoind. Rasio amina menjadi imina membentuk berbagai struktur, seperti *leucoemeraldine* (tereduksi penuh), *emeraldine* (50% teroksidasi) dan *pernigraniline* (bentuk teroksidasi penuh).



Gambar 2.2 Polianilin teroksidasi dan tereduksi

Polianilin dapat disintesis baik dalam lingkungan asam (Gambar 2.3) maupun basa. Hal ini disebabkan oleh adanya gugus NH- dalam kerangka polimer, protonasi / deprotonasi yang menyebabkan perubahan pada konduktivitas elektronik serta warna (Dhawan et al., 1997).



Gambar 2.3 Voltammogram Polianilin dalam HCl pada Permukaan *Indium Tin Oxide* (ITO) terhadap SCE : a. pH 0; b. pH 1; c. pH 2; pH 3 scan rate 100 mV/s

Salah satu metode sintesis PANI yaitu secara elektrokimia. Kelebihan metode ini antara lain: polimerisasi dapat dikontrol dengan baik dan reaksi elektrokimia lebih bersih karena tidak ada bahan kimia tambahan seperti surfaktan pada polimerisasi kimia sehingga diperoleh PANI dalam bentuk murni (Bhadra et al., 2009). Elektro polimerisasi anilin pada elektroda logam dapat dipisahkan menjadi dua tahap. Tahap pertama adalah polimerisasi pada permukaan elektroda atau sebagian elektroda tertutup oleh PANI. Pada tahap ini permukaan elektroda menjadi salah satu faktor yang mempengaruhi laju polimerisasi. Saat pertama lapisan tipis polianilin terdeposisi pada permukaan elektroda logam, polimerisasi anilin menjadi lebih sulit, sehingga tingkat polimerisasi rendah. Tahap kedua adalah polimerisasi pada elektroda benar-benar tertutup oleh PANI. Polimerisasi anilin di tahap kedua akan tergantung pada morfologi film yang terbentuk sebelumnya. Diharapkan struktur PANI yang terbentuk kaya akan pori, sehingga tingkat polimerisasi akan meningkat. Struktur dengan tingkat polimerisasi tinggi adalah PANI dengan struktur morfologi butiran (*granular*) atau jaring (*net*). Oksidasi PANI adalah *irreversible* sehingga oksidasinya meningkat seiring dengan peningkatan potensial yang diberikan, akan tetapi potensial yang tinggi menyebabkan kerusakan pada PANI (Wang et al., 1987).

Metode polimerisasi anilin secara elektrokimia umumnya menggunakan : arus konstan (galvanostatik), yaitu metode dasarnya terdiri dari perakitan dua elektroda dicelupkan dalam larutan elektrolit yang mengandung monomer dan arus pada tingkat tertentu dilewatkan untuk membentuk *film* PANI pada permukaan elektroda platina. Potensial konstan (potensiostatik), polimerisasi anilin pada potensial konstan menghasilkan polimer bubuk yang melekat lemah pada elektroda. Potensial dinamik (voltametri siklik), oksidasi anilin secara kontinyu pada potensi yang telah ditentukan menghasilkan lapisan tipis yang dapat melekat pada permukaan elektroda. Lapisan ini dapat direduksi atau dioksidasi untuk mengendalikan konduktivitasnya. Lapisan yang lebih tebal dapat diproduksi dan terkelupas dari permukaan elektroda untuk menghasilkan polimer konduktif bebas.

2.3 Partikel Nano Emas

Partikel nano logam didefinisikan sebagai partikel logam yang berukuran antara 1 dan 50 nm. Nano partikel diketahui terdapat dalam bermacam bentuk seperti bola (*spherical*), kubik, pentagonal dan balok (*rod-shaped*). Sifat partikel nano yang paling utama adalah memiliki warna berbeda-beda bergantung besar diameternya (Abdullah, 2009), bentuk dan *agent* penstabil yang dikontrol selama proses preparasi. Sedangkan ukuran dan keseragaman nano partikel tergantung pada jenis dan jumlah *agent* pereduksi yang digunakan dalam sintesis.

Partikel nano logam dapat dibuat secara fisik maupun kimia. Metode fisik pada umumnya melibatkan deposisi uap dan pembagian *bulk* prekursor menjadi partikel nano dan metode kimia dimulai dari reduksi ion logam menjadi atom dan diikuti dengan pengaturan agregasi dan pemisahan atom. Keuntungan dari metode kimia adalah ukuran partikel yang kecil dan seragam (Guo dan Wang, 2007).

Persiapan paling sederhana dan umum yang digunakan untuk membuat partikel nano emas adalah dengan reduksi HAuCl_4 oleh natrium sitrat. Pembentukan emas nano partikel ditandai dengan perubahan warna pada larutan, dimulai dari kuning menjadi tidak berwarna, berlanjut menjadi biru tua, kemudian merah tua dan akhirnya menjadi merah anggur. Koloid didinginkan ketika warna sudah menjadi merah anggur (Kurniawan et al., 2006). Diameter partikel nano tergantung oleh konsentrasi natrium sitrat (Tri-natrium sitrat) yang ditambahkan. Tabel 2.1 berikut menunjukkan diameter partikel nano emas dengan penambahan natrium sitrat 1% pada 50 mL HAuCl_4 0,01%.

Tabel 2.1 Pengaruh Konsentrasi Na-sitrat Pada Ukuran Partikel Nano Emas

Na-Sitrat (mL)	Diameter (nm)
1	16
0,75	25
0,5	41
0,3	72
0,21	98
0,16	147

Sumber : Kharitonov et al. (2000).

Penelitian terhadap partikel nano emas terus berkembang karena cocok dalam bidang ilmu biologi, mempunyai konduktivitas sangat bagus dan perbandingan antara permukaan dan volumenya tinggi (Guo dan Wang, 2007). Partikel nano emas dapat menjebak biomolekul sehingga mampu mempertahankan bioaktivitasnya, Keuntungan ini menyebabkan partikel nano emas sering digunakan untuk penyusunan biosensor. Selain itu, partikel nano emas memungkinkan transfer elektron langsung antara protein dengan elektroda yang berguna sebagai elektro katalis proses redoks dalam reaksi biokimia.

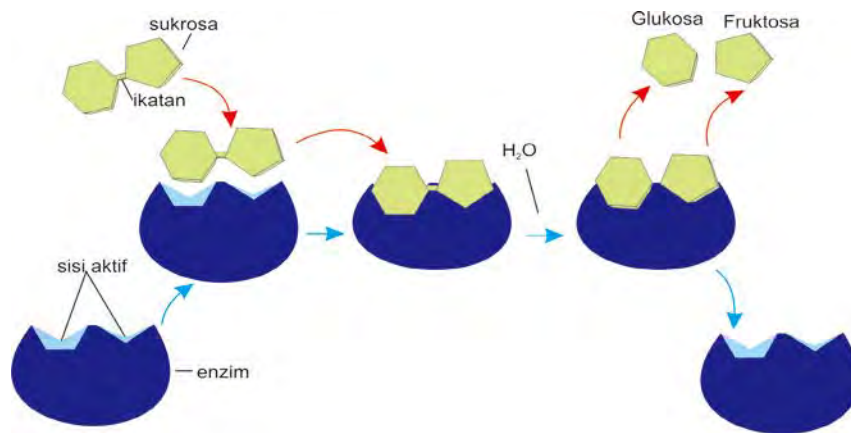
Partikel nano emas telah berhasil digunakan untuk memodifikasi permukaan elektroda. Karena modifikasi pada elektroda dengan partikel nano emas memungkinkan perluasan permukaan aktif untuk amobilisasi biomolekul seperti enzim serta memfasilitasi aliran elektron antara permukaan padat dan biomolekul. Dengan demikian, batas deteksi yang lebih baik diperoleh dibandingkan dengan biosensor tanpa modifikasi partikel nano (Kurniawan et al., 2006 ; Kerman et al., 2008 dan Ozdemir et al., 2010).

2.4 Enzim Invertase

Sistem tatanama untuk enzim Invertase menurut *International Union of Biochemistry and Molecular Biology*, yang disebut sebagai nomor EC (*enzyme commission*) adalah E.C. 3.2.1.26. Angka pertama (3) menunjukkan nama kelas hidrolase (reaksi hidrolisis), kedua (2) untuk sub kelas glikosidase (katalis hidrolisis ikatan glikosida), ketiga (1) untuk sub-sub kelas (hidrolisis O- pada gugus glikosil) dan keempat (26) untuk β -fruktofuranosidase sebagai terminal hidrolisis. adalah β -D-Fruktofuranosidase. Hasil hidrolisis sukrosa merupakan campuran ekimolar dari α -D-glukosa β -D-fruktosa, yang dikenal sebagai gula invert.

Proses hidrolisa sukrosa oleh enzim Invertase menjadi gula invert dipengaruhi oleh pH dan kebersihan lingkungan. Inversi terjadi pada kondisi asam (pH dibawah 7) dan juga tergantung pada kondisi temperatur tertentu. Pada temperatur tinggi reaksi inversi dapat berlangsung dengan cepat. Akan tetapi temperatur yang terlalu tinggi dapat menyebabkan denaturasi protein. Denaturasi

ini disebabkan rusaknya struktur protein dari sisi aktif enzim. Proses hidrolisa sukrosa menjadi gula invert ditunjukkan pada Gambar 2.4 berikut :



Gambar 2.4 Pengikatan Substrat oleh Enzim Invertase (Bergamasco et al., 2000)

Enzim Invertase dapat dihasilkan dari fermentasi *Saccharomyces cerevisiae*. Enzim Invertase ada 2 (dua) jenis, yaitu : Invertase amobil dan Invertase bebas. Invertase menunjukkan aktivitas yang relatif tinggi pada kisaran pH 3,5 – 5,5 dan optimum pada pH 4,5. Aktifitas maksimum Invertase amobil terlihat pada suhu 65 – 70°C sedangkan Invertase bebas pada 55 – 65°C, pada suhu di atas 70 °C kinerja kedua enzim tersebut menurun. Invertase bersifat larut dalam air akan tetapi tidak larut dalam etanol dan eter.

2.5 Amobilisasi Enzim Invertase

Amobilisasi enzim berarti lokalisasi molekul enzim dalam/pada suatu pendukung untuk proses katalitik secara terus menerus. Lokalisasi molekul enzim dapat melalui adsorpsi ke polimer yang tidak larut dalam air. Secara umum, amobilisasi enzim bertujuan untuk menjaga atau meningkatkan stabilitas dalam penyimpanan (Azodi et al., 2011), suhu, pH operasional, .karena enzim merupakan biokatalis yang pada umumnya mudah larut dan tidak stabil. Dalam bentuk bebasnya, enzim hanya dapat digunakan sekali pemakaian. Enzim aktif yang dijebak tidak hilang selama proses katalisis, sehingga dapat digunakan

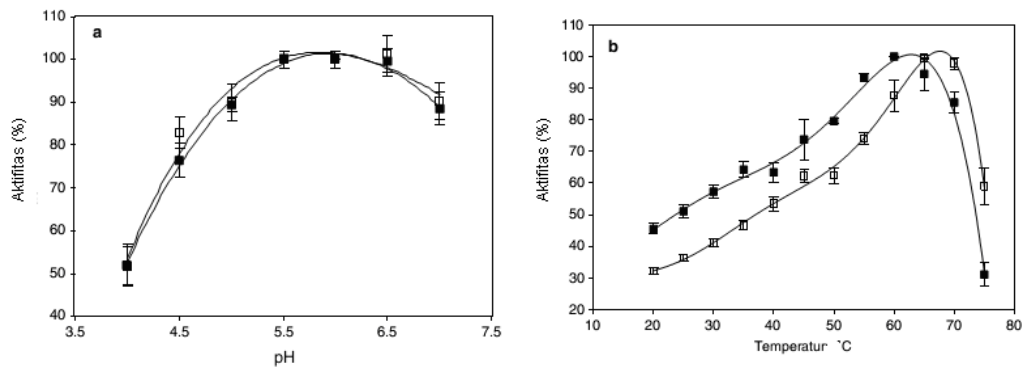
secara kontinyu. Enzim dapat mempertahankan 86% aktivitasnya selama proses penjebakan (Rebros et al., 2007).

Terdapat beragam teknik amobilisasi enzim dalam pendukung. Interaksi setiap protein dan material pendukung memiliki karakter tertentu, sehingga tidak ada metode amobilisasi yang ideal secara universal. Akan tetapi enzim dapat mempertahankan aktivitas katalitik yang tinggi dan yang paling penting enzim amobil bisa digunakan berulang. Sebagai contoh ketika pendukung untuk amobilisasi berbentuk solid dan non-porous, maka ukuran partikel harus sekecil mungkin (Valerio et al., 2012).

Teknik amobilisasi biomolekul dalam polimer konduktif yang diaplikasikan sebagai biosensor dapat dilakukan secara fisik, kovalen dan elektrokimia. Polimer konduktif sebagai contoh polianilin merupakan polimer dengan konduktivitas tinggi dapat dibuat sebagai bahan semikonduktif dan untuk digunakan dalam biosensor dan amobilisasi enzim.

Penjebakan enzim dalam film polimer konduktif merupakan metode pengendalian atau lokalisasi molekul biologis aktif pada elektroda. Polimer konduktif memiliki kemampuan untuk mentransfer muatan listrik yang dihasilkan oleh reaksi biokimia dan dapat diendapkan pada daerah yang ditentukan seperti elektroda. Sifat-sifat ini memungkinkan polimer konduktif sebagai penjebak enzim sehingga dapat dimanfaatkan untuk pembuatan biosensor amperometri. Invertase dapat dijebak dalam polipirol (Selampinar et al., 1997 dan Erginer et al., 2000), politiofene yang tidak dapat disintesis dalam pelarut air (Cirpan et al., 2003), serat komposit PAN/PANI (Azodi et al., 2011), dalam lapisan silikon berpori. Interaksi elektrostatis antara Invertase dan polimer konduktif adalah yang terkuat di sekitar pH 5,5 (Bayramoglu et al., 2009).

Karakter enzim Invertase amobil terkait terhadap suhu, pH dan konsentrasi substrat. Kemampuan Invertase amobil dan bebas menghidrolisis sukrosa terhadap pengaruh pH dan temperatur ditunjukkan pada Gambar 2.5.



Gambar 2.5 Aktifitas Enzim Invertase Bebas (□) dan Amobil (■) pada Variasi (a) pH (b) Temperatur (Amaya-Delgado et al., 2006)

Secara umum, enzim tidak stabil selama penyimpanan dalam larutan dan aktivitasnya berkurang secara bertahap. Stabilitas penyimpanan Invertase amobil ditunjukkan dalam Tabel 2.2.

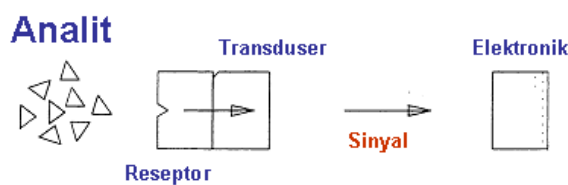
Tabel 2.2 Aktifitas Enzim Invertase Amobil Selama Penyimpanan dalam Pelarut

Penyimpanan pada Suhu 4°C (dalam pelarut)	Aktifitas Invertase Amobil (%)
Natrium Azida 0,015%	76
Gliserol 20%	80
Aquademin	85
Buffer Asetat (0,05 M ; pH 5,5)	78
Buffer Asetat (0,05 M ; pH 4,5)	95

Sumber : Amaya-Delgado et al. (2006)

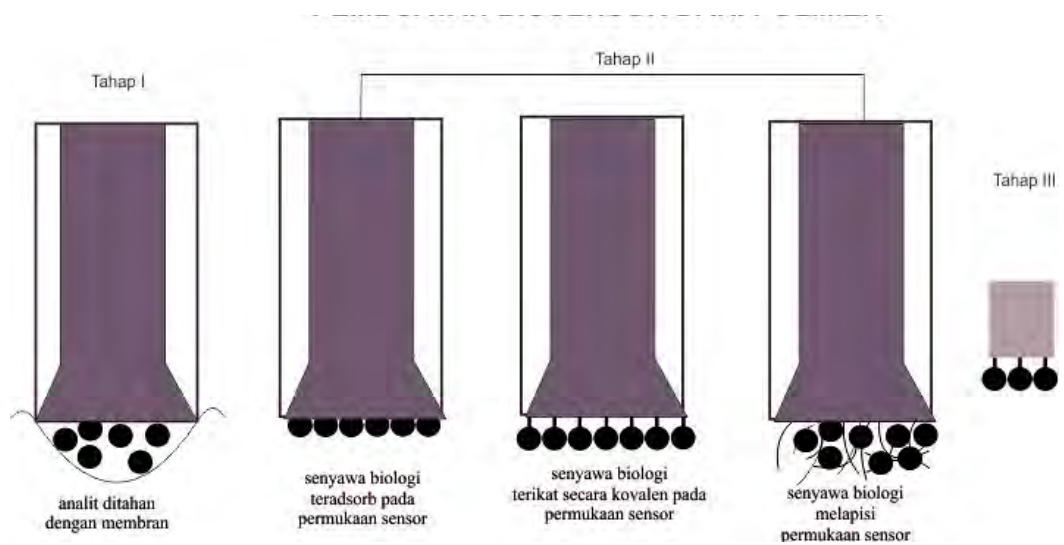
2.6 Biosensor

Biosensor adalah pengindera dimana salah satu elemen perangkatnya terdiri atas komponen biologi. Biosensor menghasilkan sinyal digital elektronik yang sebanding dengan konsentrasi zat/bahan kimia tertentu. Perangkat biosensor beroperasi secara spesifik, cepat, sederhana, dapat dengan mudah dibuat. Skema umum dari biosensor ditunjukkan pada Gambar 2.6 berikut.



Gambar 2.6 Perangkat Umum Biosensor

Ada tiga generasi perkembangan biosensor. Biosensor generasi pertama, produk reaksi berdifusi ke transduser dan menyebabkan respon listrik. Generasi kedua melibatkan mediator antara reaksi dan transduser. Reaksi redoks antara enzim dan substrat, teroksidasi kembali oleh mediator. Kemudian mediator teroksidasi oleh elektroda sehingga respon yang diberikan meningkat. Pada generasi ketiga, respon yang dihasilkan merupakan hasil dari reaksi itu sendiri bukan dari respon difusi produk atau mediator (Ahuja et al., 2007). Generasi biosensor tersebut ditunjukkan pada Gambar 2.7 berikut :



Gambar 2.7 Generasi dari Biosensor (Deshpande, 1993)

Amobilisasi biomolekul ke polimer konduktif merupakan pengembangan biosensor generasi ketiga. Dimana biomolekul dijebak pada polimer untuk mengendalikan biomolekul aktif yang terlokalisasi pada elektroda.

Pemahaman tentang desain biosensor masih terus dibahas yaitu: mekanisme amobilisasi enzim ke dalam polimer konduktif, perbandingan matriks polimer terhadap enzim yang akan dijebak, mekanisme transfer elektron dalam konfigurasi yang berjalan pada permukaan elektroda dan proses transport massa pada antarmuka polimer.

2.7 Biosensor sukrosa

Prototype biosensor sukrosa (amperometri) dikembangkan untuk mengukur sukrosa dalam makanan dan minuman. Preparasi chip sensor secara elektropolimerisasi m-phenylene diamine pada elektrode platina. enzim Invertase, mutarotase dan glukosa oksidase dijebak dalam polimer saat elektropolimerisasi pada potensial +0.65 V terhadap SCE. sensor berjalan pada potensial 0.7 V vs SCE. Glukosa oksidase diamobilisasi dalam film polimetaphenylenediamine (poli 1,3 DAB) secara elektropolimerisasi kemudian mutarotase dan Invertase diamobilisasi secara co-crosslinked dengan BSA dan glutaraldehid di atas elektroda poli 1,3 DAB/GOX (Klinchan et al., 2002)

"Halaman ini sengaja dikosongkan"

BAB 3

METODA PENELITIAN

3.1 Peralatan dan Bahan

3.1.1 Peralatan

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini meliputi peralatan gelas sederhana, seperangkat alat destilasi, homogenizer, sonikator pemecah sel, sentrifuge, mikroskop optik Olympus BX60 dan pH meter. Pengukuran respon arus dengan menggunakan potensiostat E-Daq E410 yang terhubung ke *e-corder* yang dimasukkan ke *software* ECHEM.dengan sistem tiga elektroda.

3.1.2 Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini meliputi, anilin (99,5%, Merck), ragi roti, sukrosa (99,5%, Merck), D(-)-Fruktosa (99%, Merck), D(+)-Glukosa monohidrat (99,5%, Merck), NaHCO₃ (99,5%, SAP), HCl (37%, Merck), NaOH (99,5%, SAP), NaH₂PO₄.H₂O (99%, Merck), Na₂HPO₄.2H₂O (99,5%, Merck), HAuCl₄.3H₂O (99,5%, Merck), Natrium Sitrat (99,5%, Sigma Aldrich), isolasi bakar (*heat shrink*), kawat emas 99.99 % dan air demin.

3.2 Prosedur Kerja

3.2.1 Pemurnian Anilin

Anilin yang berwarna merah kecoklatan terlebih dahulu dimurnikan dengan cara destilasi sederhana, yaitu dengan memasukkan 10 mL anilin ke dalam labu destilasi dan ditambahkan batu didih kemudian labu dipanaskan dalam *oil bath* hingga destilasi mencapai temperatur 180°C. Destilat yang diperoleh ditempatkan dalam wadah yang dilapisi aluminium foil dan disimpan dalam pendingin.

3.2.2 Ekstraksi Enzim Invertase dari Ragi Roti

Isolasi enzim Invertase dari ragi roti sesuai yang dilakukan oleh Hasanah dan Putra (2010). Ragi roti sebanyak 50 gram ditimbang dan dimasukkan ke dalam gelas kimia lalu ditambahkan 100 mL NaHCO₃ 0,1 M dan diaduk hingga

menjadi bubur ragi. Selanjutnya bubur ragi dimasukkan ke dalam homogenizer, diaduk pada 7000 rpm selama 5 menit. Bubur yang dihasilkan dituang ke dalam erlenmeyer, lalu mulut erlenmeyer ditutup dengan kapas yang sudah dibalut kain kasa, aluminium foil dan diinkubasi pada suhu ruang selama 24 jam. Selanjutnya diautolisis dengan menggunakan ultrasonik pada 16 rms selama 20 menit. Setelah proses autolisa ini campuran disentrifugasi selama 10 menit dengan kecepatan 3500 rpm. Proses ini membentuk dua lapisan yaitu lapisan supernatan dan biomassa. Lapisan tersebut didekantasi dan diperoleh supernatannya.

3.2.3 Preparasi Elektroda Emas

Emas batangan 99.99% ditempa dan dibentuk menjadi kawat emas dengan diameter 1 milimeter. Kawat emas dipotong sepanjang 5 cm lalu dicuci menggunakan aquademin dan dikeringkan. Setelah itu kawat emas dimasukkan ke dalam isolasi bakar dan dipanaskan sampai melekat rapat pada kawat. Salah satu permukaan kawat diratakan dengan amplas grade 1200. Kawat ini dinamakan elektroda emas dan selanjutnya siap untuk digunakan.

3.2.4 Sintesis Partikel Nano Emas

Sintesis partikel nano emas dilakukan sesuai dengan metode Kurniawan et al. (2006), yaitu : larutan HAuCl_4 1 mM dipipet 10 mL dan dipanaskan hingga mendidih kemudian ditambahkan 1 mL natrium sitrat 1% sambil diaduk menggunakan *magnetic bar*. Warna larutan akan berubah dari kuning pucat menjadi merah anggur. Setelah itu larutan didinginkan lalu disimpan pada suhu kamar. Pengukuran diameter rata-rata partikel nano emas hasil sintesis telah dilakukan oleh Kurniawan et al. (2006) menggunakan SEM (LEO SUPRA35) dan diperoleh hasil sekitar 14 nm.

3.2.5 Modifikasi Elektroda Emas dengan Polianilin, Enzim Invertase dan Emas nano partikel

Modifikasi elektroda kerja emas dengan polianilin dan enzim invertase dilakukan menggunakan potensiostat dengan teknik voltametri siklik. Elektroda pembanding adalah Ag/AgCl dalam 3 M KCl (+207 mV vs. SHE), elektroda bantu adalah kawat Pt dengan diameter 2,5 mm.

3.2.5.1 Elektropolimerisasi Anilin pada Permukaan Elektroda Emas

Monomer anilin 0,1 M dalam HCl 0,5 M pada pH 1,5 dipolimerisasi pada permukaan elektroda emas dilakukan secara elektropolimerisasi dengan *scan rate* 50 mV/s sebanyak 20 siklik pada potensial -500 sampai dengan +1000 mV. Elektroda emas termodifikasi dengan PANI kemudian direndam dalam larutan buffer fosfat. Untuk mengamati perubahan pada permukaan elektroda digunakan mikroskop optik. Elektroda ini kemudian disebut elektroda emas termodifikasi PANI.

3.2.5.2 Penjebakan Invertase pada Permukaan Elektroda Emas Termodifikasi Polianilin

Enzim invertase dilarutkan dalam buffer fosfat. Penjebakan invertase pada permukaan elektroda emas termodifikasi PANI dilakukan secara elektrokimia dengan *scan rate* 50 mV/s sebanyak 20 siklik pada potensial -500 sampai dengan +1000 mV. Elektroda emas termodifikasi PANI dan invertase kemudian dilihat permukaannya menggunakan mikroskop optik.

3.2.5.3 Deposisi Partikel nano emas pada Permukaan Elektroda Emas Polianilin Invertase

Deposisi partikel nano emas dilakukan dengan teknik lapis demi lapis. Elektroda emas termodifikasi PANI dan invertase direndam ke dalam koloid partikel nano emas selama 15 menit, dikeringkan pada suhu kamar, perlakuan ini diulang dua kali setelah itu direndam kembali selama 24 jam. Permukaan elektroda emas termodifikasi PANI, invertase dan partikel nano emas dilihat menggunakan mikroskop optik.

3.2.6 Deteksi Sukrosa

3.2.6.1 Deteksi Sukrosa dengan Elektroda Emas dan Elektroda Emas Termodifikasi

Larutan uji dibuat dengan cara melarutkan sukrosa dalam pelarut buffer fosfat, kemudian dianalisa menggunakan potensiostat dengan teknik voltametri siklik sistem tiga elektroda. Elektroda pembanding adalah Ag/AgCl dalam 3 M KCl (+0,207 V vs. SHE), elektroda bantu adalah kawat Pt dengan diameter 2,5 mm dan elektroda kerja merupakan elektroda emas atau elektroda emas

termodifikasi PANI, elektroda emas termodifikasi PANI dan invertase, elektroda emas termodifikasi PANI, invertase dan partikel nano emas. Potensial yang diberikan berkisar antara -1000 sampai dengan +1000 mV dengan *scan rate* 100 mV/s sebanyak 5 siklik.

3.2.6.2 Deteksi Sukrosa dengan Variasi pH Larutan Uji

Larutan uji disiapkan dengan melarutkan sukrosa dalam pelarut buffer fosfat. Kondisi larutan diatur tingkat keasamannya pada kisaran pH 3 sampai 11. Metode pengukuran yang digunakan adalah voltammetri siklik sistem tiga elektroda. Potensial yang diberikan berkisar antara -1000 sampai dengan +1000 mV dengan *scan rate* 100 mV/s sebanyak 5 siklik.

3.2.6.3 Penentuan Limit Deteksi dan Sensitivitas Elektroda terhadap Sukrosa

Larutan uji disiapkan dengan melarutkan sukrosa dalam pelarut buffer fosfat dengan konsentrasi sukrosa 1 hingga 50 mM. Kondisi larutan diatur tingkat keasaman optimum yang diperoleh dari pengamatan sebelumnya. Metode pengukuran yang digunakan adalah voltammetri siklik sistem tiga elektroda. Potensial yang diberikan berkisar antara -1000 sampai dengan +1000 mV dengan *scan rate* 100 mV/s sebanyak 5 siklik. Limit deteksi dan sensitivitas elektroda ditentukan.

3.2.6.4 Penentuan Selektivitas Elektroda terhadap Fruktosa, Glukosa dan Sukrosa

Enzim invertase mengatalis hidrolisis sukrosa menjadi glukosa dan fruktosa. Analisa ini dilakukan untuk menguji apakah fruktosa dan glukosa memiliki efek pada analisis sukrosa. Sukrosa, glukosa dan fruktosa masing-masing dilarutkan dalam pelarut buffer fosfat. Selanjutnya larutan fruktosa, glukosa dan sukrosa pada konsentrasi yang sama diatur tingkat keasamannya. Masing-masing larutan tersebut dianalisa menggunakan voltammetri siklik sistem tiga elektroda. Potensial yang diberikan berkisar antara -1000 sampai dengan +1000 mV dengan *scan rate* 100 mV/s sebanyak 5 siklik. Selektivitas elektroda terhadap sukrosa, glukosa dan fruktosa ditentukan.

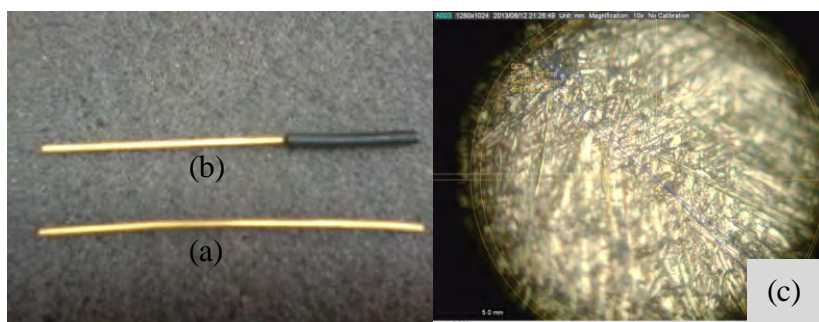
BAB 4

HASIL DAN PEMBAHASAN

Penelitian ini dilakukan untuk memodifikasi elektroda emas dengan polianilin, enzim invertase dan partikel nano emas. Elektroda modifikasi ini akan digunakan sebagai biosensor sukrosa. Persiapan awal yang dilakukan yaitu : pemurnian anilin, ekstraksi enzim invertase dari ragi roti, sintesis partikel nano emas dan pembentukan emas batangan menjadi kawat yang kemudian dilapisi dengan isolasi bakar (*heat shrink*). Kinerja biosensor terhadap sukrosa diuji dengan membandingkan respon antara elektroda sebelum dan sesudah modifikasi. Sensitivitas elektroda terhadap sukrosa dihitung menggunakan kurva kalibrasi yang diperoleh, sedangkan selektivitasnya diujikan terhadap fruktosa dan glukosa yang merupakan pengganggu dan mungkin ada dalam sampel uji.

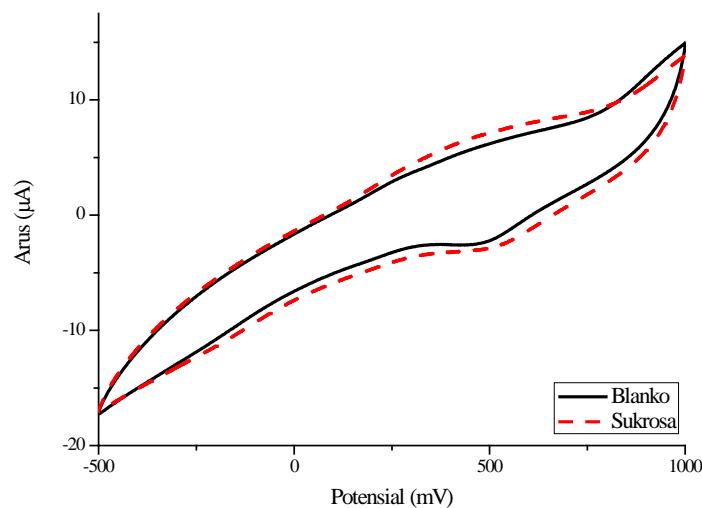
4.1 Elektroda Emas

Elektroda emas disiapkan dengan membentuk emas batangan menjadi kawat dengan diameter 1 milimeter. Kawat emas dipotong sepanjang 5 cm lalu dicuci menggunakan aquademin dan dikeringkan. Setelah itu kawat emas dimasukkan ke dalam isolasi bakar dan dipanaskan sampai melekat rapat pada kawat. Salah satu permukaan kawat diratakan dengan amplas grade 1200. Elektroda emas sebelum dan setelah dibungkus isolasi bakar serta foto permukaan elektroda emas yang telah diampas dapat dilihat pada Gambar 4.1 di bawah ini.



Gambar 4.1 (a) Elektroda emas sebelum dibungkus isolasi bakar, (b) Elektroda emas setelah dibungkus isolasi bakar, (c) Foto permukaan elektroda emas menggunakan mikroskop optik.

Kinerja elektroda emas terhadap sukrosa diuji dengan metode elektrokimia. Elektroda emas dicelupkan ke dalam sukrosa 100 mM yang telah dilarutkan dengan buffer fosfat 50 mM kemudian diberikan potensial -500 hingga +1000 mV dengan *scan rate* 100 mV/s sebanyak 5 siklus. Respon arus elektroda emas dapat dilihat pada Gambar 4.2.



Gambar 4.2 Voltammogram respon elektroda emas terhadap sukrosa 100 mM dalam buffer pH 6,78 dengan *scan rate* 100 mV/s

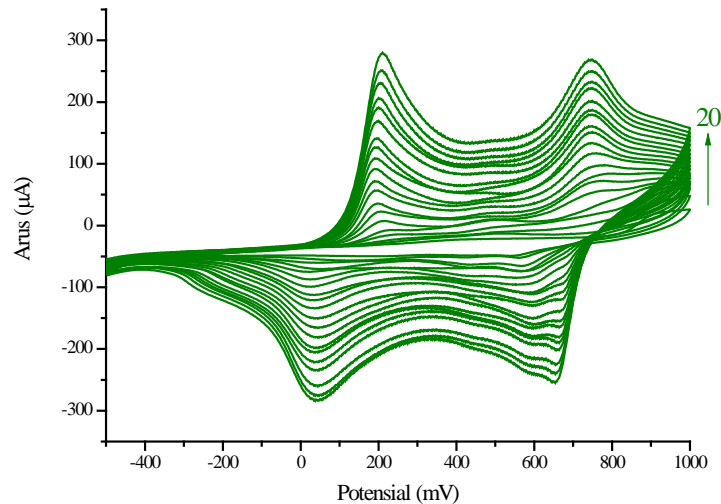
Voltammogram menunjukkan bahwa nilai arus sukrosa sama dengan blanko hampir di semua potensial (-500 hingga +1000 mV), yang artinya elektroda emas tidak memberikan respon terhadap sukrosa. Hal ini dikarenakan tidak adanya reaksi redoks pada permukaan elektroda emas.

4.2 Modifikasi Elektroda Emas

4.2.1 Modifikasi Elektroda Emas dengan Polianilin (PANI)

Polianilin disintesis secara elektrokimia atau elektropolimerisasi menggunakan metode voltametri siklik. Elektropolimerisasi dilakukan dalam wadah yang berisi monomer anilin 0,1 M dalam HCl 0,5 M dengan konfigurasi tiga elektroda, yaitu elektroda pembanding, elektroda bantu dan elektroda kerja. Elektroda pembanding yang digunakan adalah Ag/AgCl dalam KCl 3 M (+207 mV vs. SHE), elektroda bantu kawat platina berdiameter 2,5 mm dan elektroda kerja kawat emas berdiameter 1 mm. Elektropolimerisasi anilin dilakukan

sebanyak 20 siklus dengan *scan rate* 50 mV/s pada potensial -500 hingga +1000 mV. Voltammogram polimerisasi anilin pada permukaan elektroda emas dapat dilihat pada Gambar 4.3.



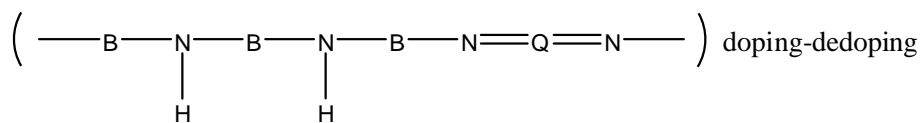
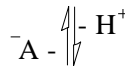
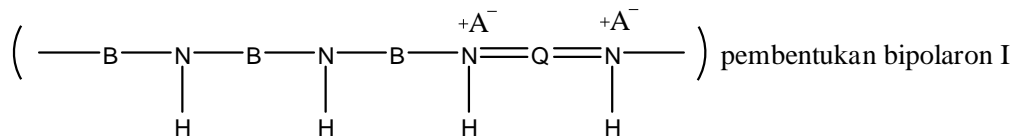
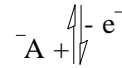
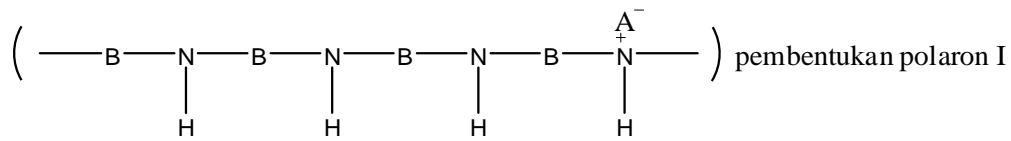
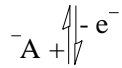
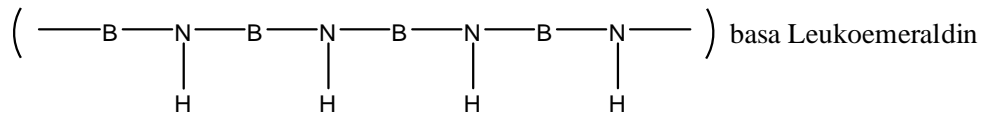
Gambar 4.3 Voltammogram polimerisasi anilin pada permukaan elektroda emas dengan *scan rate* 50 mV/s

Voltammogram pada Gambar 4.3 di atas menunjukkan peningkatan arus puncak oksidasi dan reduksi seiring dengan bertambahnya siklus yaitu dari siklus pertama hingga siklus ke-20. Puncak oksidasi di daerah 197 mV mempunyai respon arus 6 hingga 276,87 μA dan di potensial 743 mV dengan nilai arus adalah 52 sampai dengan 269,2 μA , sedangkan puncak reduksi di potensial 44 mV dan 654 mV dengan arus secara berurut adalah -54,825 hingga -284 μA dan -36,715 hingga -255,132 μA . Menurut Xu et al. (2010) dan Dhand et al. (2011) puncak di daerah 200 mV merupakan puncak oksidasi perubahan leucoemeraldin (PANI dalam bentuk tereduksi penuh) menjadi emeraldin (PANI dalam bentuk setengah teroksidasi), sedangkan di sekitar 800 mV adalah puncak oksidasi perubahan emeraldin ke pernigranilin (PANI dalam bentuk teroksidasi penuh).

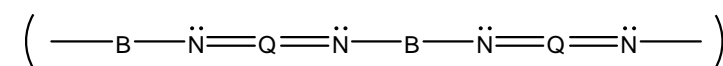
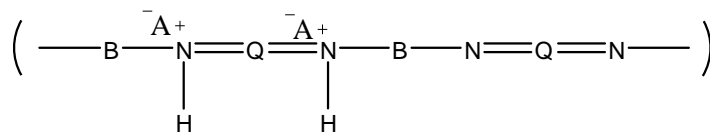
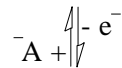
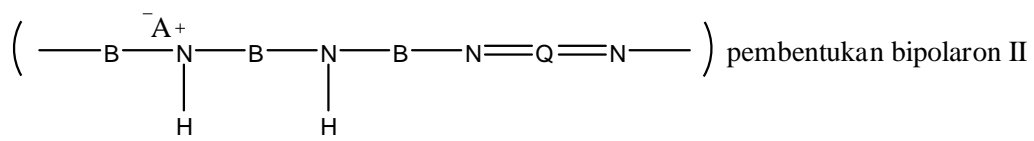
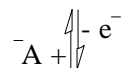
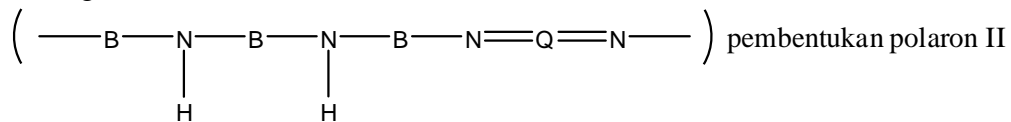
Pada penelitian ini, polimerisasi dilakukan pada pH 1,5 karena polimer konduktif seperti polianilin terbentuk dari kopling *head to tail* yang hanya terjadi pada kondisi asam, sedangkan pada kondisi lainnya yang terjadi hanya kopling *head to head* yang membentuk polimer tidak terkonjugasi (tidak konduktif)

(Deshpande and Amalnerkar, 1993 ; Dhawan et al., 1997). Proses doping-dedoping pada saat polimerisasi polianilin sebagai berikut :

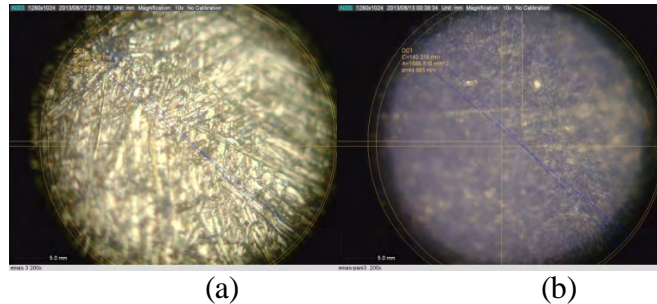
1. Pasangan redoks pertama



2. Pasangan redoks kedua



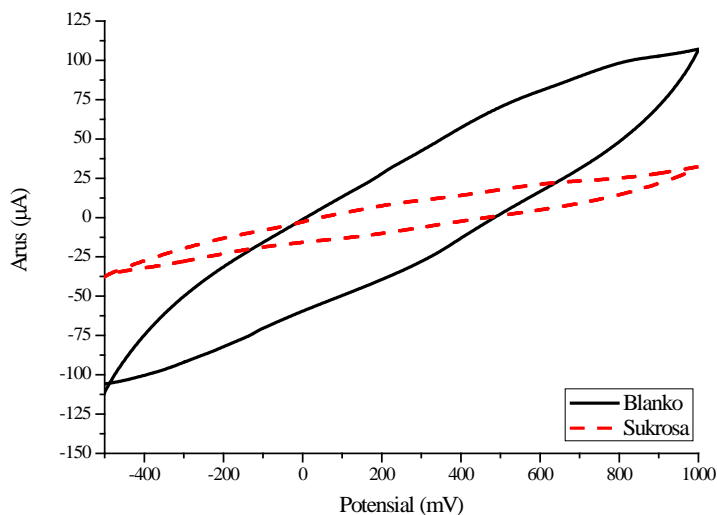
Oksidasi anilin secara kontinu pada potensial yang telah ditentukan menghasilkan lapisan tipis yang dapat melekat pada permukaan elektroda kerja emas. Perubahan morfologi permukaan elektroda diamati menggunakan mikroskop optik. Foto perubahan permukaan elektroda sebelum dan setelah modifikasi dapat dilihat pada Gambar 4.4 sebagai berikut :



Gambar 4.4 (a) Foto permukaan elektroda kerja emas sebelum modifikasi, (b) sesudah termodifikasi dengan PANI

Gambar 4.4 (a) dan (b) menyajikan foto permukaan elektroda kerja emas yang berwarna kuning keemasan dan setelah termodifikasi oleh PANI, permukaan elektroda emas tertutup oleh PANI yang berwarna hijau kehitaman.

Respon elektroda emas termodifikasi PANI terhadap sukrosa ditunjukkan pada Gambar 4.5. Pada voltammogram ini terlihat bahwa di daerah potensial 46 hingga 644 mV respon arus blanko berbeda secara signifikan terhadap sukrosa. Respon elektroda terhadap blanko secara berurut adalah 5,542 dan 84,498 μA sedangkan sukrosa 0,058 dan 22,279 μA . Elektroda emas termodifikasi PANI menjadi lebih sensitif terhadap larutan buffer fosfat atau larutan blanko dibandingkan dengan sukrosa. Hal ini terjadi dikarenakan buffer fosfat bersifat lebih elektrolit dibandingkan sukrosa sehingga terjadi transfer elektron antara buffer fosfat dengan PANI sebagai polimer konduktif yang melekat pada permukaan elektroda. Akan tetapi pada voltammogram tidak menunjukkan adanya puncak kenaikan arus di sepanjang potensial tersebut, sehingga dapat disimpulkan bahwa elektroda emas termodifikasi PANI belum dapat digunakan sebagai biosensor sukrosa karena tidak sensitif terhadap sukrosa.



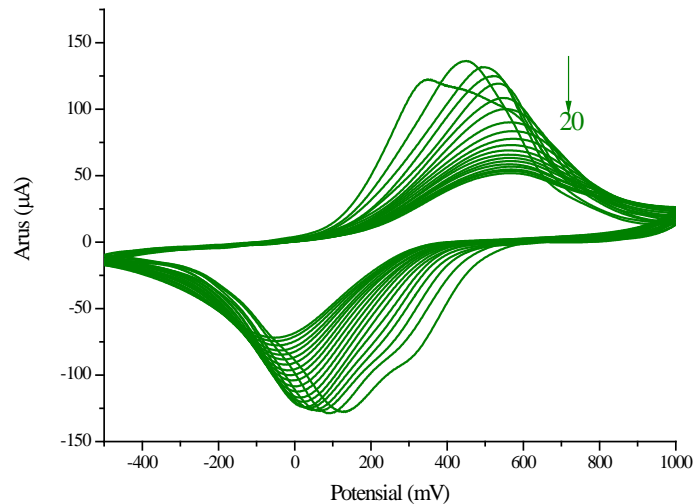
Gambar 4.5 Voltammogram respon elektroda emas termodifikasi PANI terhadap sukrosa 100 mM dalam buffer pH 6,78 dengan *scan rate* 100 mV/s

4.2.2 Modifikasi Elektroda Emas dengan PANI dan Invertase

Modifikasi elektroda emas dilanjutkan dengan penjebakan invertase pada permukaan elektroda emas termodifikasi PANI secara elektrokimia. Elektroda emas termodifikasi PANI dicelupkan ke dalam enzim invertase yang dilarutkan dengan buffer fosfat 1 M, kemudian diberikan potensial -500 hingga +1000 mV dengan *scan rate* 50 mV/s sebanyak 20 siklus. Penjebakan invertase tidak dilakukan secara bersamaan dengan polimerisasi anilin meskipun teknik yang digunakan sama. Hal ini dikarenakan PANI yang bersifat konduktif terbentuk pada saat polimerisasi dalam kondisi asam, sedangkan sifat enzim yang peka terhadap pH membuatnya hanya dapat bekerja pada kisaran pH netral (Cui dan Park, 1999; Jannakoudakis dan Mikkelsen, 1998 dalam Yu and Sundmacher, 2007).

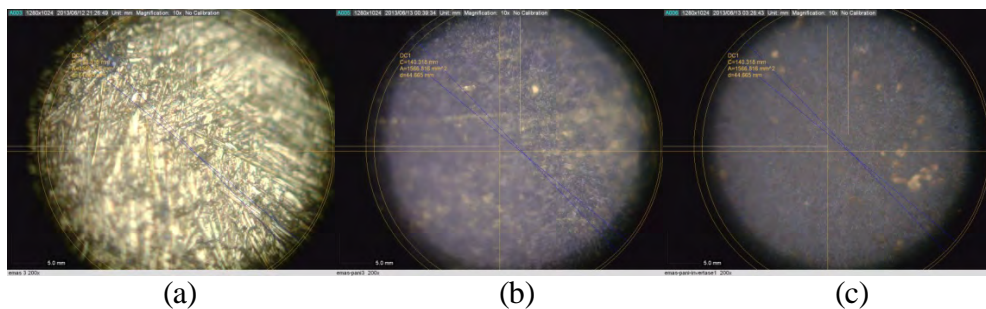
Voltammogram penjebakan enzim invertase (Gambar 4.6) menunjukkan hanya terdapat satu puncak oksidasi di daerah 505 mV. Tumpang tindih puncak oksidasi disebabkan oleh peningkatan pH larutan, sehingga dua puncak redoks bergerak lebih dekat. Puncak tersebut merupakan puncak leukoemeraldin atau permigranilin (Xu et al., 2010). Voltammogram ini juga menampilkan arus yang menurun dari 132 ke 49,6 μA , seiring dengan bertambahnya jumlah sapuan.

Voltammogram penjebakan enzim invertase di permukaan elektroda emas termodifikasi PANI ditunjukkan pada Gambar 4.6 di bawah ini :



Gambar 4.6 Voltammogram penjebakan enzim invertase pada permukaan elektroda emas termodifikasi PANI

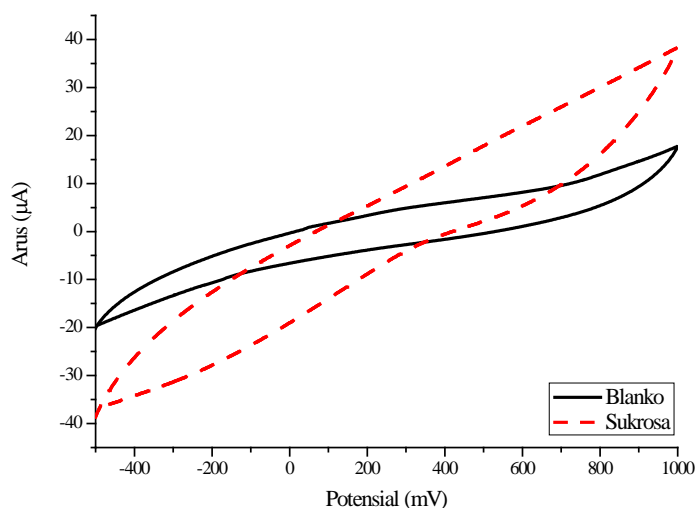
Permukaan elektroda emas termodifikasi PANI setelah penjebakan enzim invertase dapat dilihat pada Gambar 4.7 (c). Pada gambar tersebut terlihat bahwa tidak terjadi perubahan warna yang signifikan pada permukaan elektroda. Hal ini dikarenakan perbesaran mikroskop optik yang digunakan tidak mampu mengamati perubahan yang terjadi hingga areal matriks polimer.



Gambar 4.7 Foto permukaan elektroda kerja emas (a) sebelum termodifikasi, sesudah termodifikasi dengan: (b) PANI; (c) PANI dan enzim invertase.

Voltammogram pada Gambar 4.8 menunjukkan bahwa elektroda emas termodifikasi PANI dan enzim invertase di daerah potensial +120 hingga +694

mV memberikan respon yang berbeda terhadap blanko dan sukrosa. Respon arus yang dihasilkan oleh blanko sebesar 2,02719 dan 9,475 μA sedangkan sukrosa sebesar 2,1275 dan 25,71219 μA . Hal ini menunjukkan bahwa enzim invertase yang terjebak dalam matriks PANI berperan atas respon elektroda emas termodifikasi PANI dan enzim invertase terhadap sukrosa. Akan tetapi arus yang terjadi bukanlah kenaikan arus oksidasi karena proses hidrolisis sukrosa menjadi glukosa dan fruktosa bukan merupakan reaksi redoks, sehingga dapat disimpulkan bahwa modifikasi elektroda emas dengan PANI dan enzim invertase tidak sensitif terhadap sukrosa.



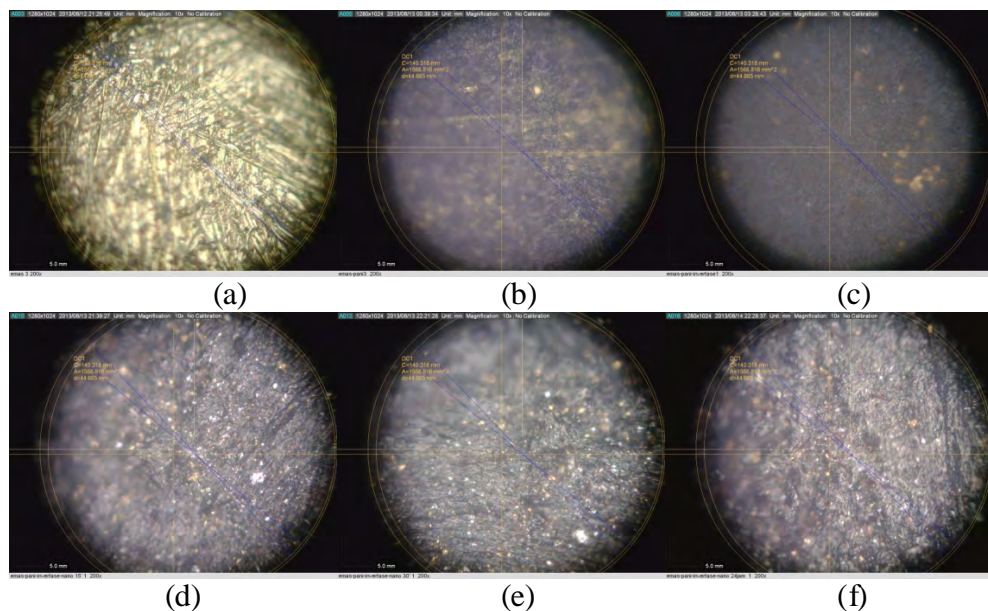
Gambar 4.8 Voltammogram respon elektroda emas termodifikasi PANI, invertase terhadap sukrosa 100 mM dalam buffer pH 6,78 dengan *scan rate* 100 mV/s

4.2.3 Modifikasi Elektroda Emas dengan PANI, Invertase dan Partikel Nano Emas

Modifikasi elektroda emas dengan PANI, invertase dilanjutkan dengan penambahan partikel nano emas. Modifikasi dengan partikel nano emas dilakukan dengan teknik deposisi lapis demi lapis. Pengukuran diameter rata-rata partikel hasil sintesis nano emas telah dilakukan oleh Kurniawan et al. (2006) dengan SEM (LEO SUPRA35) dan diperoleh hasil sekitar 14 nm. Elektroda emas yang telah dimodifikasi polianilin dan invertase direndam ke dalam koloid partikel nano emas selama 15 menit dan selanjutnya dikeringkan pada suhu kamar,

perlakuan ini diulang sebanyak dua kali. Perendaman yang ketiga dilakukan selama 24 jam. Semakin banyak pengulangan deposisi partikel nano emas akan menghasilkan lapisan emas yang sempurna pada permukaan elektroda, akan tetapi hal ini menyebabkan penurunan stabilitasnya (Kurniawan et al., 2006), sehingga deposisi hanya dilakukan tiga kali pengulangan.

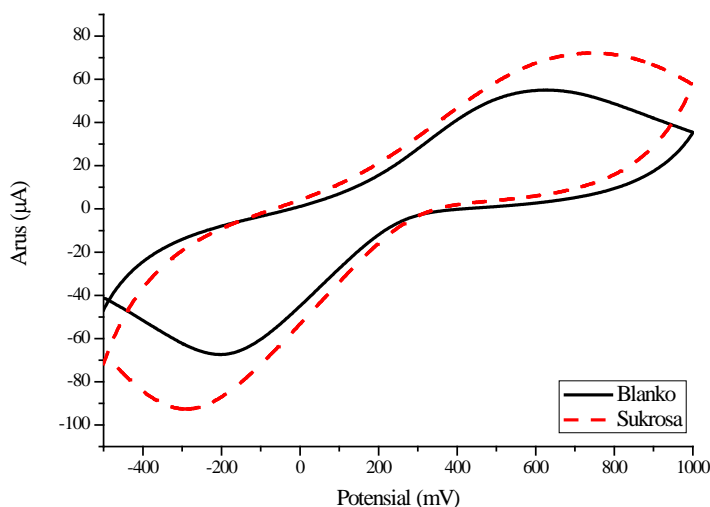
Morfologi permukaan elektroda emas termodifikasi PANI, invertase, partikel nano emas diamati menggunakan mikroskop optik. Foto perubahan-perubahan permukaan elektroda dari sebelum dan setelah modifikasi dapat dilihat pada Gambar 4.9.



Gambar 4.9 Foto permukaan elektroda kerja emas (a) sebelum modifikasi, sesudah modifikasi dengan : (b) PANI; (c) PANI dan enzim invertase; PANI, enzim invertase dan partikel nano emas dengan perendaman (d) 15 menit; (e) 30 menit; (f) 24 jam.

Gambar 4.9 (d), (e) dan (f) menunjukkan perubahan pada permukaan elektroda emas termodifikasi PANI, invertase dan partikel nano emas. Pada gambar tersebut dapat dilihat bahwa setelah perendaman dalam koloid partikel nano emas, penampang permukaan elektroda menjadi lebih mengkilap.

Deteksi sukrosa dilakukan dengan elektroda emas termodifikasi PANI, invertase dan partikel nano emas. Respon arus elektroda ini dapat dilihat pada Gambar 4.10.



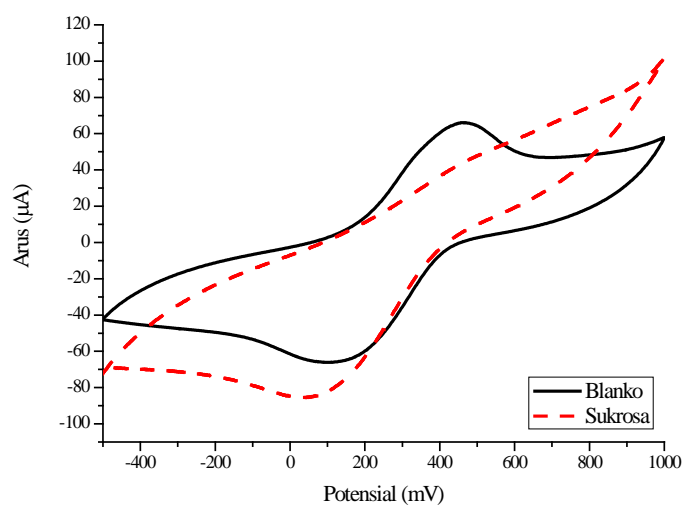
Gambar 4.10 Voltammogram respon elektroda emas termodifikasi PANI, invertase dan partikel nano emas terhadap sukrosa 100 mM dalam buffer pH 6,78 dengan *scan rate* 100 mV/s

Penambahan partikel nano emas pada modifikasi elektroda juga dapat meningkatkan sinyal dari sampel dibandingkan tanpa penambahan partikel nano emas (Ozdemir et al., 2010). Hal ini dapat dilihat pada daerah potensial 200 hingga 685 mV. Jika dibandingkan dengan respon elektroda emas termodifikasi PANI dan invertase maka elektroda emas termodifikasi PANI, invertase dan partikel nano emas mempunyai respon tiga kali lebih besar terhadap sukrosa. Elektroda emas termodifikasi PANI, invertase dan partikel nano emas selanjutnya digunakan sebagai biosensor sukrosa.

4.3 Penentuan pH Optimum Larutan Uji terhadap Kinerja Elektroda Emas Termodifikasi PANI, Invertase dan Partikel Nano Emas

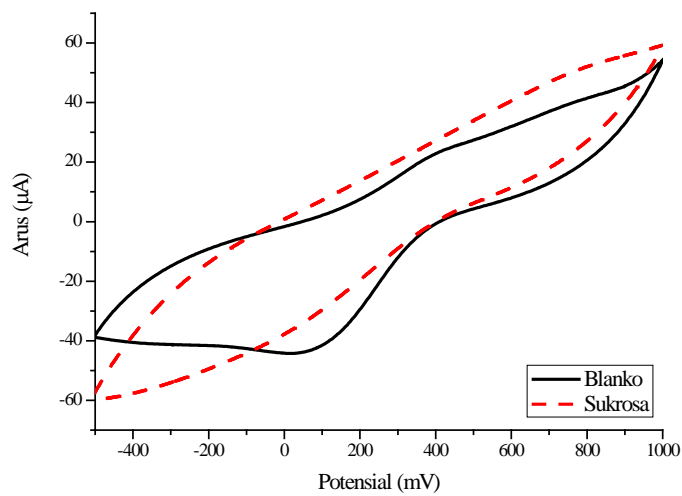
Enzim memiliki pH optimum yang khas. Kemampuan enzim invertase baik yang bebas maupun invertase amobil menghidrolisis sukrosa juga dipengaruhi oleh pH. Interaksi enzim dan material pendukung pada proses amobilisasi memiliki karakter tertentu, sehingga kinerja elektroda kerja yang dimodifikasi dengan enzim tidak lepas dari penentuan pH optimal kinerja elektroda. Pada penelitian ini, biosensor diujikan pada sukrosa dengan variasi pH larutan uji 3 sampai dengan 11.

Pada Gambar 4.11 voltammogram elektroda emas termodifikasi PANI, invertase dan partikel nano emas dalam larutan uji pH 3,18 menunjukkan tidak sensitif terhadap sukrosa. Hal ini karena enzim invertase dalam elektroda emas termodifikasi PANI, invertase dan partikel nano emas kehilangan sifat untuk mengikat substrat (sukrosa) ke sisi aktif. Struktur tersier dan sekunder enzim terpisah menjadi untaian tunggal saat ikatan hidrogen antar untaian rusak atau mengalami denaturasi pada kondisi asam.

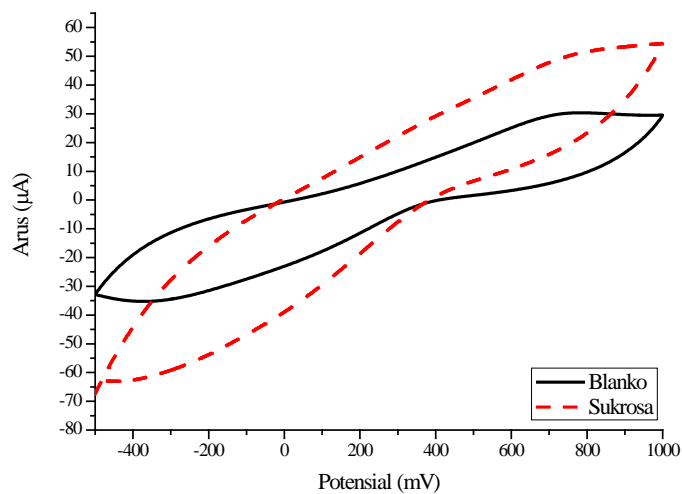


Gambar 4.11 Voltammogram respon elektroda emas termodifikasi PANI, invertase dan partikel nano emas terhadap sukrosa 100 mM dalam buffer pH 3,18 dengan *scan rate* 100 mV/s

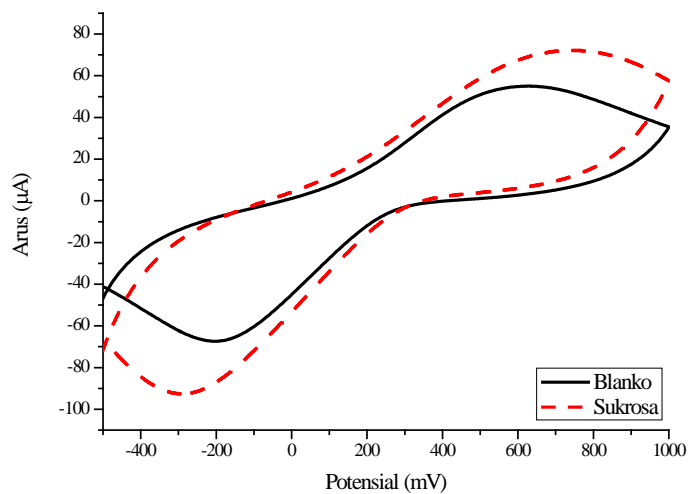
Berdasarkan voltammogram pada Gambar 4.12 – 4.14 dapat dilihat bahwa elektroda emas termodifikasi PANI, invertase dan partikel nano emas dalam larutan uji pH 5,27 ; 6,14 dan 6,78 memberikan respon pada potensial 196,2 hingga 568,3 mV yang tidak diberikan oleh elektroda dalam pH 3,18. Menurut Amaya-Delgado et al. (2006) enzim invertase bebas maupun amobil hanya mempunyai aktivitas 50% pada pH di bawah 4, sedangkan pada kisaran pH 5 hingga 7 menunjukkan aktivitas maksimum.



Gambar 4.12 Voltammogram respon elektroda emas termodifikasi PANI, invertase dan partikel nano emas terhadap sukrosa 100 mM dalam buffer pH 5,27 dengan *scan rate* 100 mV/s

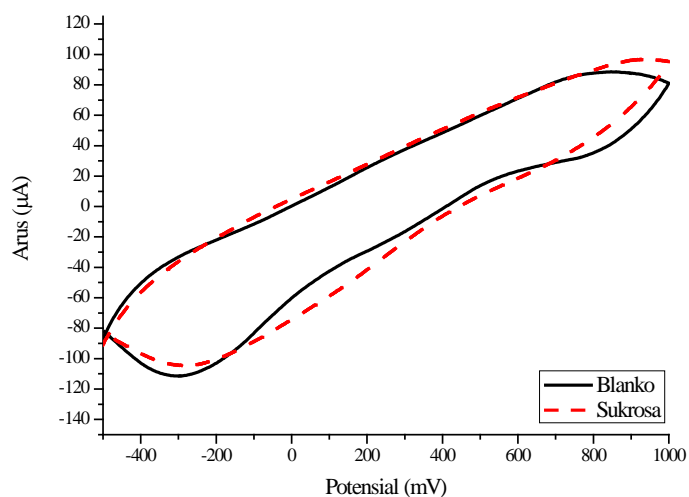


Gambar 4.13 Voltamogram Respon Elektroda Emas termodifikasi PANI, Invertase dan Partikel nano emas terhadap Sukrosa 100 mM dalam Buffer pH 6,14 dengan *scan rate* 100 mV/s

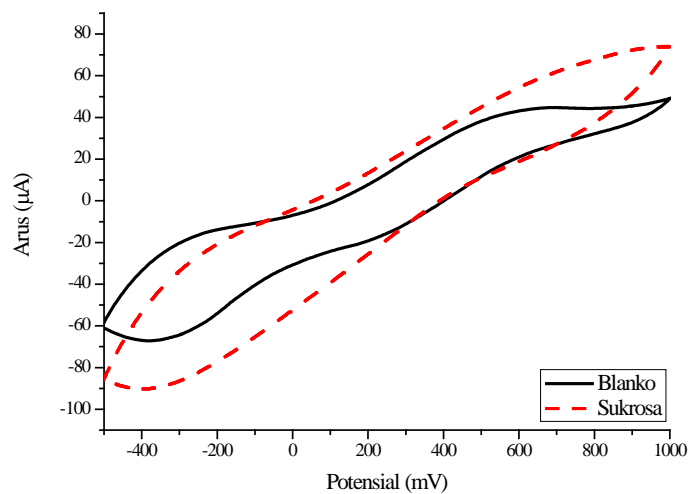


Gambar 4.14 Voltammogram respon elektroda emas termodifikasi PANI, invertase dan partikel nano emas terhadap sukrosa 100 mM dalam buffer pH 6,78 dengan *scan rate* 100 mV/s

Voltammogram elektroda dalam larutan uji pH 7,05 dan 7,89 seperti yang terlihat pada Gambar 4.15 – 4.16 menunjukkan respon elektroda emas termodifikasi PANI, invertase dan partikel nano emas yang tidak sensitif terhadap sukrosa.

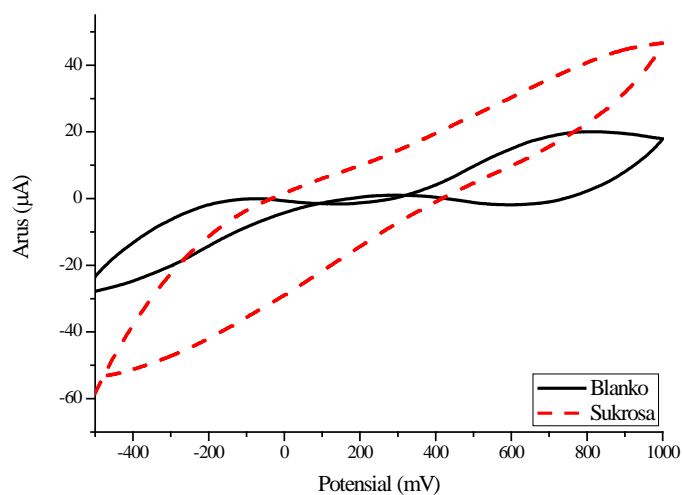


Gambar 4.15 Voltammogram respon elektroda emas termodifikasi PANI, invertase dan partikel nano emas terhadap sukrosa 100 mM dalam buffer pH 7,05 dengan *scan rate* 100 mV/s

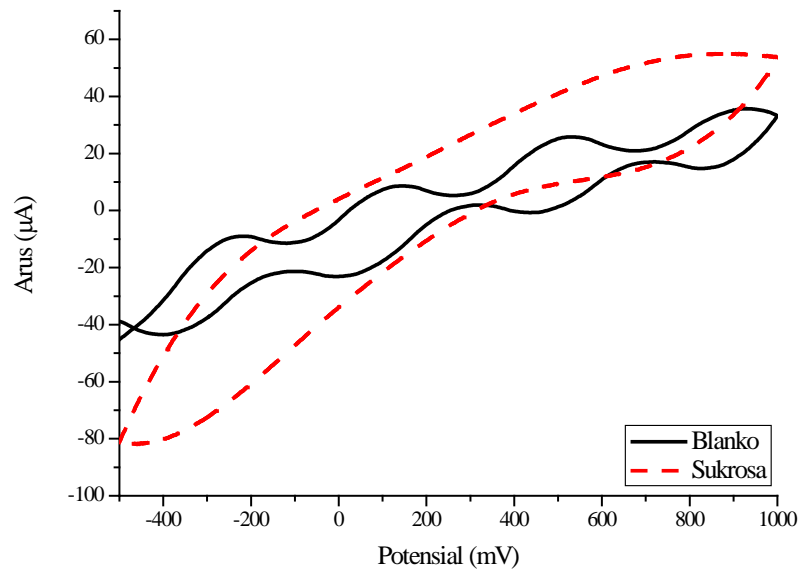


Gambar 4.16 Voltammogram respon elektroda emas termodifikasi PANI, invertase dan partikel nano emas terhadap sukrosa 100 mM dalam buffer pH 7,89 dengan *scan rate* 100 mV/s

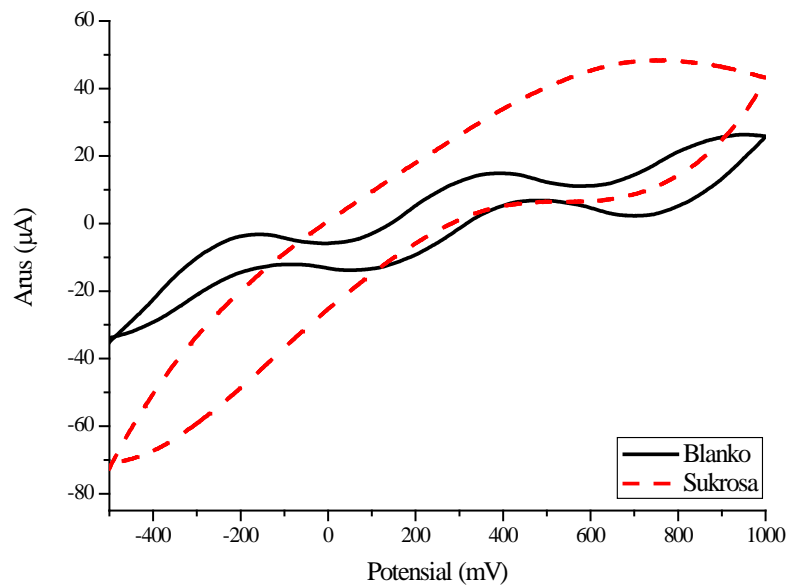
Peningkatan pH larutan uji menjadi 8.47 ; 10.76 dan 11.36 tidak membuat respon elektroda emas termodifikasi PANI, invertase dan partikel nano emas semakin tinggi, seperti yang terlihat pada Gambar 4.17 – 4.19 di bawah ini :



Gambar 4.17 Voltammogram respon elektroda emas termodifikasi PANI, invertase dan partikel nano emas terhadap sukrosa 100 mM dalam buffer pH 8,47 dengan *scan rate* 100 mV/s



Gambar 4.18 Voltammogram respon elektroda emas termodifikasi PANI, invertase dan partikel nano emas terhadap sukrosa 100 mM dalam buffer pH 10,76 dengan *scan rate* 100 mV/s



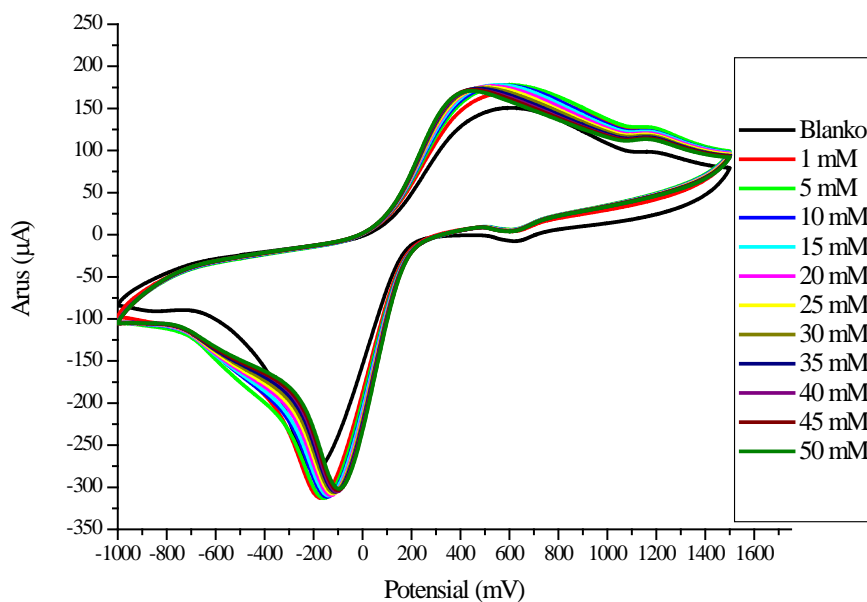
Gambar 4.19 Voltammogram respon elektroda emas termodifikasi PANI, invertase dan partikel nano emas terhadap sukrosa 100 mM dalam buffer pH 11,36 dengan *scan rate* 100 mV/s

Pada gambar tersebut terlihat bahwa pada kondisi pH 8.47, 10.76 dan 11.36 larutan buffer tidak lagi dapat mempertahankan perubahan pH karena telah

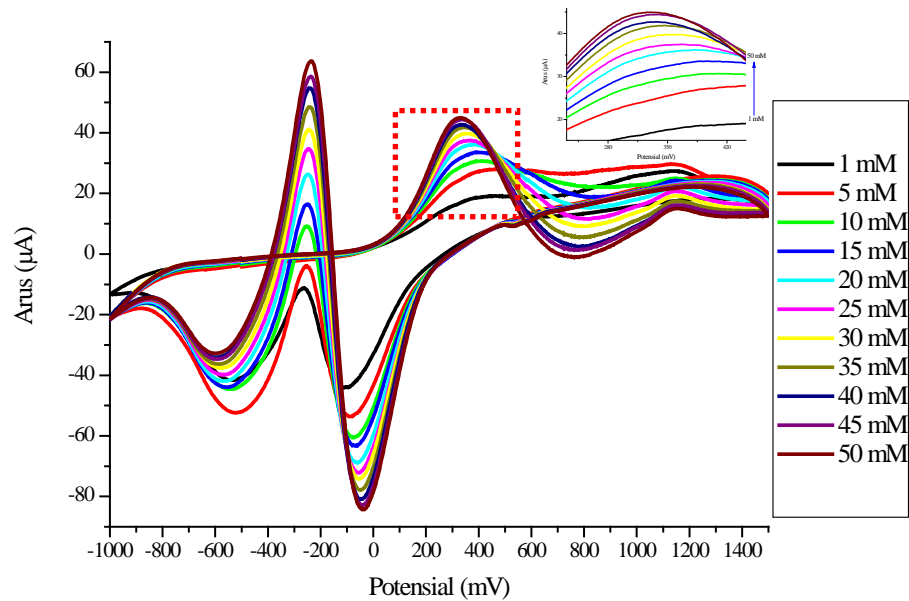
melebihi kapasitas larutan buffer. Buffer hanya dapat mempertahankan pH satu tingkat di atas dan di bawahnya (Herawati, 2008). Sehingga buffer fosfat pH 7 tidak dapat berfungsi sebagai blanko pada pH 8,47 ; 10,76 dan 11,36, karena pKa buffer fosfat pH 7 adalah 6,865. Akibatnya, respon sukrosa tidak dapat dianalisa dengan baik.

4.4 Penentuan Limit Deteksi dan Sensitivitas Elektroda terhadap Sukrosa

Limit deteksi dan sensitivitas elektroda termodifikasi ditentukan dari kurva kalibrasi. Pada Gambar 4.20 menunjukkan voltammogram mengalami peningkatan arus seiring dengan naiknya konsentrasi di potensial 200 hingga 400 mV. Hal ini dapat dilihat dari voltammogram selisih respon sukrosa tiap konsentrasi terhadap respon blanko yang ditunjukkan pada Gambar 4.21.

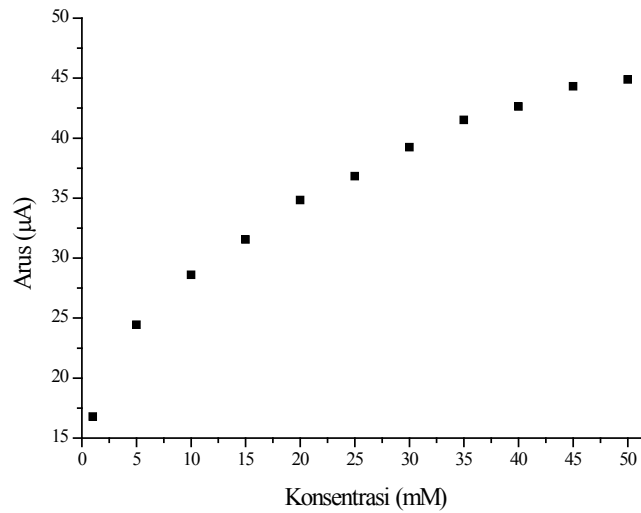


Gambar 4.20 Voltammogram respon elektroda emas termodifikasi PANI, invertase dan partikel nano emas terhadap larutan sukrosa 0 – 50 M dalam buffer pH 6,78 dengan *scan rate* 100 mV/s



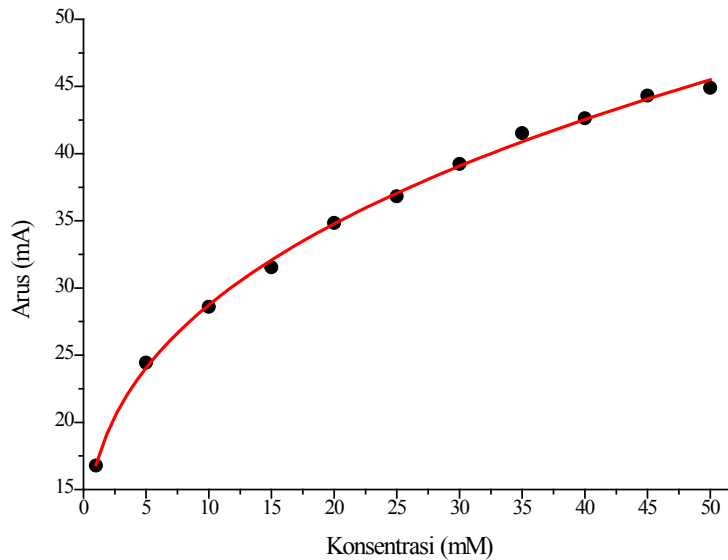
Gambar 4.21 Voltammogram selisih respon elektroda emas termodifikasi PANI, invertase dan partikel nano emas terhadap larutan sukrosa 1 – 50 M dan blanko pada pH 6,78 di daerah 275 – 400 mV dengan *scan rate* 100 mV/s

Peningkatan konsentrasi sukrosa cenderung meningkatkan aktivitas enzim invertase hingga menghasilkan sinyal arus yang konstan. Gambar 4.22 menunjukkan kurva landai pada konsentrasi 45 hingga 50 mM dengan nilai arus masing-masing adalah 44,32 dan 44,89 μA . Nilai arus yang cenderung konstan terjadi seiring meningkatnya konsentrasi sukrosa, semakin banyak enzim invertase bebas yang diubah menjadi kompleks invertase-sukrosa. Pada kondisi ini semua sisi aktif enzim invertase akan berikatan dengan sukrosa sehingga jumlah kompleks invertase-sukrosa adalah sama dengan jumlah total enzim bebas yang ada.



Gambar 4.22 Kurva respon arus elektroda emas termodifikasi PANI, invertase dan partikel nano emas terhadap deret larutan sukrosa dalam buffer pH 6,78 dengan *scan rate* 100 mV/s pada potensial 328 mV

Kurva kalibrasi puncak oksidasi pada potensial 328 mV dapat dilihat pada Gambar 4.23 berikut :



Gambar 4.23 Kurva kalibrasi konsentrasi sukrosa terhadap respon arus elektroda emas termodifikasi PANI, invertase dan partikel nano emas

Kurva kalibrasi pada Gambar 4.23 di atas menunjukkan kurva hiperbolik. Kurva tersebut menghubungkan signal arus terhadap konsentrasi sukrosa dengan persamaan :

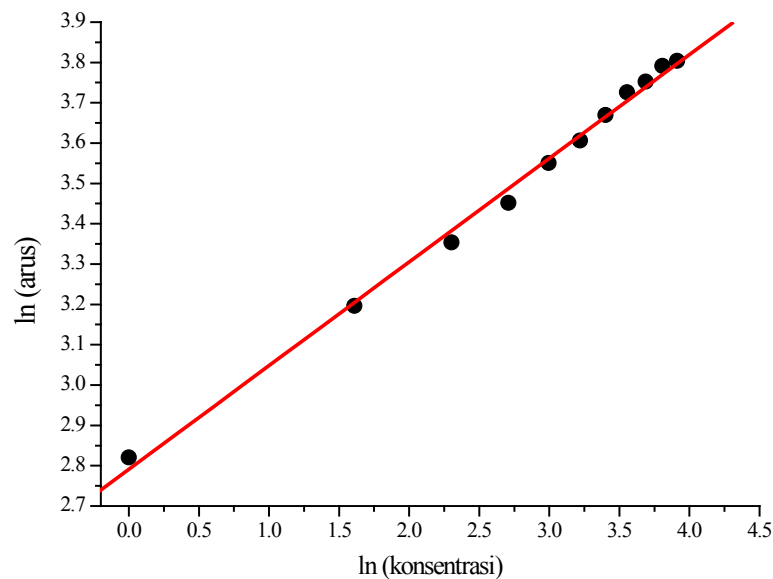
$$y = 7,8476 + 8,9968 x^{0,3659}$$

dengan R^2 sebesar 0,9983. Persamaan garis tersebut dapat disederhanakan menjadi

$$\ln y = \ln 7,8476 + \ln 8,9968 + 0,3659 \ln x$$

$$\ln y = 4,2571 + 0,3659 \ln x$$

Bentuk persamaan matematis sederhana akan menghasilkan hubungan yang linier antara konsentrasi terhadap respon arus dengan $R^2 = 0,9975$, sebagaimana yang ditunjukkan pada Gambar 4.24 di bawah ini.



Gambar 4.24 Kurva Linier Konsentrasi Sukrosa terhadap Respon Arus Elektroda emas termodifikasi PANI, invertase dan partikel nano emas.

Sensitivitas ditentukan sebagai kemiringan bagian linier konsentrasi sukrosa terhadap respon arus elektroda. Uji sensitivitas dilakukan untuk mengetahui kepekaan elektroda terhadap analit. Hasil perhitungan menunjukkan bahwa sensitivitas elektroda emas termodifikasi PANI, invertase dan partikel nano emas sebesar $0,4657 \mu\text{A} \cdot \text{mm}^{-2} \cdot \text{mM}^{-1}$. Limit deteksi adalah konsentrasi terendah

dari analit dalam sampel yang dapat dideteksi. Nilai limit deteksi dihitung dari jumlah nilai rata-rata blanko dengan tiga kali standar deviasinya. Data hasil pengukuran arus dari blanko dapat dilihat pada Tabel 4.1 berikut :

Tabel 4.1 Tabel Data Pengukuran Elektroda Modifikasi terhadap Blanko

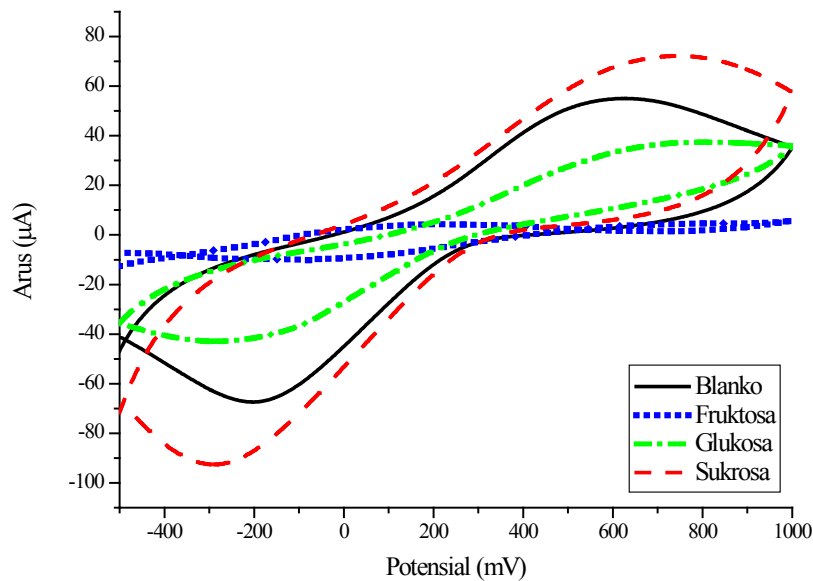
Sinyal Arus Blanko pada Pengukuran ke- (μA)				Sinyal Arus Rata-rata (μA)	Standar Deviasi (σ)
1	2	3	4		
107,592	99,136	101,215	105,631	103,394	3,895

Hasil perhitungan didapat bahwa arus dari blanko adalah 115,079 μA . Apabila diplotkan pada persamaan hiperbolik maka akan diperoleh limit deteksi elektroda emas termodifikasi PANI, invertase dan partikel nano emas sebesar 9 μM .

4.5 Penentuan Selektivitas Elektroda Emas Termodifikasi PANI, Invertase dan Partikel Nano Emas terhadap Fruktosa, Glukosa dan Sukrosa

Sukrosa merupakan disakarida yang dibentuk dari glukosa dan fruktosa yang terhubung melalui ikatan glikosida. Proses hidrolisis oleh enzim invertase akan memecah ikatan glikosida dan mengubah sukrosa menjadi glukosa dan fruktosa. Hasil analisa penentuan pH optimum larutan uji terhadap kinerja elektroda emas termodifikasi PANI, invertase dan partikel nano emas menunjukkan bahwa pada pH 6,78 dapat mendeteksi sukrosa. Hal ini telah disebutkan oleh Amaya-Delgado et al. (2006) enzim invertase bebas dan amobil menunjukkan aktivitas maksimum pada kisaran pH 5 hingga 7.

Pada penelitian ini dilakukan uji selektivitas elektroda emas termodifikasi PANI, invertase dan partikel nano emas terhadap sukrosa dan gula penyusun sukrosa yaitu fruktosa dan glukosa dengan konsentrasi yang sama yaitu 100 mM. Voltammogram respon elektroda emas termodifikasi PANI, invertase, partikel nano emas terhadap sukrosa, fruktosa dan glukosa 100 mM ditunjukkan pada Gambar 4.25.



Gambar 4.25 Voltammogram respon elektroda emas termodifikasi PANI, invertase dan partikel nano emas terhadap sukrosa, fruktosa dan glukosa 100 mM dalam buffer pH 6,78 dengan *scan rate* 100 mV/s

Gambar 4.25 menunjukkan voltammogram respon elektroda emas termodifikasi PANI, invertase dan partikel nano emas terhadap sukrosa di potensial 400 – 600 mV adalah 5,49 – 12,63 μA sedangkan voltammogram glukosa berada di bawah voltammogram larutan blanko. Elektroda emas termodifikasi PANI, invertase dan partikel nano emas tidak memberikan respon terhadap fruktosa. Hal ini dikarenakan fruktosa merupakan jenis gula yang tidak dapat dioksidasi karena termasuk monosakarida ketosa sedangkan glukosa merupakan monosakarida aldosa sehingga glukosa dapat dioksidasi. Oksidasi glukosa oleh partikel nano emas pada permukaan elektroda telah dilaporkan oleh Kurniawan et al. (2006), Zhou et al. (2009) dan Ozdemir et al. (2010).

Selektivitas elektroda emas termodifikasi PANI, invertase dan partikel nano emas diujikan untuk menentukan apakah biosensor sukrosa dapat digunakan untuk pengukuran sampel tanpa terganggu oleh kehadiran fruktosa dan glukosa. Sehingga koefisien selektivitas elektroda yang ideal pada metode amperometri adalah sama dengan nol (Wang, 1994) . Menurut Wang (1994), koefisien selektivitas ($k_{i,j}^{amp}$) untuk sensor amperometri ditentukan dengan mengukur

perubahan respon arus yang terjadi karena adanya senyawa pengganggu. Penentuan koefisien selektivitas diberikan pada persamaan berikut :

$$\frac{i_{ij}}{i_i} = 1 + k_{i,j}^{amp} \frac{C_j}{C_i}$$

Persamaan tersebut di atas dapat digunakan pada dalam penelitian ini, dimana i_i dan i_j adalah respon arus elektroda emas termodifikasi PANI, invertase dan partikel nano emas sebelum dan setelah adanya penambahan gula pengganggu, sedangkan C_i dan C_j adalah jumlah konsentrasi sukrosa dan konsentrasi gula pengganggu yang ditambahkan. Tabel 4.2 menunjukkan nilai koefisien selektivitas elektroda emas termodifikasi PANI, invertase dan partikel nano emas dengan penambahan fruktosa dan glukosa dengan konsentrasi masing-masing adalah 50 mM.

Tabel 4.2 Koefisien Selektivitas Elektroda Emas Termodifikasi PANI, Invertase dan Partikel nano emas

Larutan Uji	Respon Arus (μA)	Koefisien Selektivitas ($k_{i,j}^{amp}$)
Sukrosa	0,5065 μA	-
Sukrosa + Fruktosa	0,4490 μA	-0,114
Sukrosa + Glukosa	0,5946 μA	0,174

Pada Tabel 4.2 di atas menunjukkan bahwa respon arus elektroda emas termodifikasi PANI, invertase dan partikel nano emas terhadap sukrosa berubah dengan adanya glukosa. Apabila dilihat dari voltammogram maka dapat dilihat juga bahwa elektroda emas termodifikasi PANI, invertase dan partikel nano emas memberikan bentuk respon yang hampir sama terhadap glukosa. Hal tersebut dikarenakan pada penelitian ini jumlah glukosa yang terdeteksi sama dengan jumlah sukrosa yang terhidrolisis. Dengan kata lain konsentrasi sukrosa sebanding dengan konsentrasi glukosa. Meskipun elektroda ini tidak selektif terhadap sukrosa saja, tetapi tetap dapat digunakan sebagai sensor sukrosa dalam tebu. Konsentrasi sukrosa dalam tebu sekitar 11 – 14% sedangkan glukosa 0,5 – 2 % (Moerdokusumo, 1993 da lam Filianty et al., 2010), sehingga kehadiran glukosa dengan konsentrasi kecil sebelum pengukuran sukrosa yang terhidrolisis dapat diabaikan.

BAB 5

KESIMPULAN

Modifikasi elektroda kerja emas dengan polianilin, enzim invertase dan partikel nano emas telah dilakukan dan diujikan pada larutan sukrosa. Elektroda termodifikasi polianilin, enzim invertase dan partikel nano emas terbukti dapat digunakan untuk penentuan kadar sukrosa. Deteksi sukrosa menggunakan elektroda termodifikasi dilakukan dengan teknik voltametri siklik dalam larutan buffer fosfat pada pH optimum 6,78. Respon arus oksidasi merupakan arus oksidasi glukosa sebagai hasil hidrolisis sukrosa, sehingga elektroda modifikasi memberikan respon terhadap sukrosa dan glukosa dengan nilai koefisien selektivitas ($k_{i,j}^{amp}$) sebesar 0,174. Nilai arus oksidasi naik seiring dengan naiknya konsentrasi sukrosa hingga sinyal arus yang dihasilkan menjadi konstan pada konsentrasi sukrosa 45 hingga 50 mM. Pembuatan kurva kalibrasi untuk penentuan sukrosa menggunakan elektroda emas termodifikasi PANI, invertase dan partikel nano emas diambil pada potensial 328 mV (puncak anodik). Kurva kalibrasi yang dihasilkan adalah kurva hiperbolik khas enzim $R = 0,9983$. Hasil perhitungan menunjukkan bahwa sensitivitas elektroda emas termodifikasi PANI, invertase dan partikel nano emas sebesar $0,4657 \mu\text{A} \cdot \text{mm}^{-2} \cdot \text{mM}^{-1}$ dengan limit deteksi sebesar $9 \mu\text{M}$.

"Halaman ini sengaja dikosongkan"

DAFTAR PUSTAKA

- Abdullah M. (2009) *Pengantar Nanosains.*, ITB, Bandung.
- Ahuja T., Mir I. A. and Kumar D. (2007) Biomolecular immobilization on conducting polymers for biosensing applications. *Biomaterials* **28**, 791–805.
- Amaya-Delgado L., Hidalgo-Lara M. E. and Montes-Horcasitas M. C. (2006) Hydrolysis of sucrose by invertase immobilized on nylon-6 microbeads. *Food chemistry* **99**, 299–304.
- Azodi M., Falamaki C. and Mohsenifar A. (2011) Sucrose hydrolysis by invertase immobilized on functionalized porous silicon. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **69**, 154–160.
- Barlikova A., Svorc J. and Miertus S. (1991) Hybrid biosensor for the determination of sucrose. *Analytica chimica acta* **247**, 83–87.
- Bayramoglu G., Karakısla M., Altıntaş B., Metin A. U., Sacak M. and Arıca M. Y. (2009) Polyaniline grafted polyacrylonitrile conductive composite fibers for reversible immobilization of enzymes: Stability and catalytic properties of invertase. *Process Biochemistry* **44**, 880–885.
- Bergamasco R., Bassetti F. J., Morales F. F. and Zanin G. M. (2000) Characterization of Free and Immobilized Invertase Regarding Activity and Energy of Activation. *Brazilian Journal of Chemical Engineering* **17**, 873–880.
- Bhadra S., Khastgir D., Singha N. K. and Lee J. W. (2009) Progress in preparation, processing and applications of polyaniline. *Progress in Polymer Science* **34**, 783–810.
- Brožová L., Holler P., Kovářová J., Stejskal J. and Trchová M. (2008) The stability of polyaniline in strongly alkaline or acidic aqueous media. *Polymer Degradation and Stability* **93**, 592–600.
- Cirpan A., Alkan S., Toppare L., Hepuzer Y. and Yagci Y. (2003) Immobilization of invertase in conducting copolymers of 3-methylthienyl methacrylate. *Bioelectrochemistry* **59**, 29–33.
- Departemen Perindustrian (2009) *Road Map Industri Gula.*, Direktorat Jenderal Industri Agro dan Kimia, Jakarta.
- Deshpande M. V. and Amalnerkar D. P. (1993) Biosensors Prepared from Electrochemically Synthesized Conducting Polymers. *Progress in Polymer Science* **18**, 623–649.

- Dhawan S. K., Kumar D., Ram M. K., Chandra S. and Trivedi D. C. (1997) Application of conducting polyaniline as sensor material for ammonia. *Sensors and Actuators B: chemical* **40**, 99–103.
- Erginer R., Toppare L., Alkan S. and Bakir U. (2000) Immobilization of invertase in functionalized copolymer matrices. *Reactive and Functional Polymers* **45**, 227–233.
- Farine S., Villard C., Moulin A., Marchis Mouren G. and Puigserver A. (1997) Comparative quantitative analysis of sucrose and related compounds using ion exchange and reverse phase chromatographic methods. *International journal of biological macromolecules* **21**, 109–114.
- Filianty F., Raharja S. and Suryadarma P. (2010) Perubahan Kualitas Nira Tebu (*Saccharum officinarum*) Selama Penyimpanan dengan Penambahan Akar Kawao (*Millettia Sp.*) dan Kulit Batang Manggis (*Gaecinia mangostana L.*) Sebagai Bahan Pengawet. *J. Tek. Ind. Pert* **20**, 57–64.
- Gerard M., Chaubey A. and Malhotra B. D. (2002) Application of conducting polymers to biosensors. *Biosensors and Bioelectronics* **17**, 345–359.
- Guo S. and Wang E. (2007) Synthesis and electrochemical applications of gold nanoparticles. *Analytica chimica acta* **598**, 181–192.
- Hasanah E. N. I. and Putra D. R. S. R. (2010) Karakterisasi Ekstrak Kasar Enzim Invertase yang Diamobilisasi dengan Ca-Alginat. *Prosiding Kimia FMIPA-ITS* **08**.
- Herawati S. (2008) Kajian Materi Larutan Buffer Asam-Basa. Thesis, ITB.
- Kerman K., Kobayashi M. and Tamiya T. (2004) Recent trends in electrochemical DNA biosensor technology. *Measurement Science and Technology* **15**.
- Kharitonov A. B., Zayats M., Lichtenstein A., Katz E. and Willner I. (2000) Enzyme monolayer-functionalized field-effect transistors for biosensor applications. *Sensors and Actuators B: Chemical* **70**, 222–231.
- Klinchan S., Choti Wongpipat W., Suwannakum T., Tanticharoen M. and Kirtikara K. (2002) Construction of Sensor Chips by Electrochemical polymerization Techniques for Sucrose Determination. *Journal of KMITNB* **12**, 12–16.
- Kurniawan F., Tsakova V. and Mirsky V. M. (2006) Gold nanoparticles in nonenzymatic electrochemical detection of sugars. *Electroanalysis* **18**, 1937–1942.
- Lembaga Riset Perkebunan Indonesia (2004) Menuju Penentuan Rendemen Tebu yang Lebih Individual. **26**, 10–12.

- Ozdemir C., Yeni F., Odaci D. and Timur S. (2010) Electrochemical glucose biosensing by pyranose oxidase immobilized in gold nanoparticle-polyaniline/AgCl/gelatin nanocomposite matrix. *Food Chemistry* **119**, 380–385.
- Rebros M., Rosenberg M., Mlichova Z. and Kristofikova L. (2007) Hydrolysis of sucrose by invertase entrapped in polyvinyl alcohol hydrogel capsules. *Food Chemistry* **102**, 784–787.
- Selampinar F., Akbulut U., Özden M. Y. and Toppare L. (1997) Immobilization of invertase in conducting polymer matrices. *Biomaterials* **18**, 1163–1168.
- Soldatkin O. O., Peshkova V. M., Dzyadevych S. V., Soldatkin A. P., Jaffrezic-Renault N. and El'skaya A. V. (2008) Novel sucrose three-enzyme conductometric biosensor. *Materials Science and Engineering: C* **28**, 959–964.
- Valerio S. G., Alves J. S., Klein M. P., Rodrigues R. C. and Hertz P. F. (2012) High Operational Stability of Invertase from *Saccharomyces cerevisiae* Immobilized on Chitosan Nanoparticles. *Carbohydrate Polymers*.
- Wang B., Tang J. and Wang F. (1987) Electrochemical polymerization of aniline. *Synthetic Metals* **18**, 323–328.
- Wang J. (1994) Selectivity coefficients for amperometric sensors. *Talanta* **41**, 857–863.
- Xu Q., Leng J., Li H., Lu G., Wang Y. and Hu X.-Y. (2010) The preparation of polyaniline/gold nanocomposites by self-assembly and their electrochemical applications. *Reactive and Functional Polymers* **70**, 663–668.
- Yu E. H. and Sundmacher K. (2007) Enzyme Electrodes for Glucose Oxidation Prepared by Electropolymerization of Pyrrole. *Process Safety and Environmental Protection* **85**, 489–493.

"Halaman ini sengaja dikosongkan"

BIODATA PENULIS



Penulis dilahirkan di Balikpapan pada tanggal 24 Agustus 1979, sebagai anak kedua dari 2 (dua) bersaudara. Penulis adalah alumnus TK Manuntung Balikpapan, SDN 009 Balikpapan Barat, SLTPN 4 Balikpapan dan SMUN 1 Balikpapan. Setelah lulus SMU penulis melanjutkan pendidikan S-1 di Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Brawijaya Malang melalui jalur UMPTN pada bulan Agustus 1997.

Penulis sempat bekerja sebagai Tenaga Harian Lepas (THL) di Bapedalda Kota Balikpapan pada tahun 2003-2005, kemudian pada tahun 2005 hingga saat ini menjadi tenaga pengajar di Politeknik Negeri Samarinda jurusan teknik kimia. Penulis menamatkan studi jenjang S-2 di Jurusan Kimia F-MIPA ITS Surabaya dengan mengambil tesis pada bidang Analitik khususnya Kemo dan Biosensor. Penulis menerima pertanyaan, kritik, saran dan diskusi melalui fitriyana79@gmail.com dan +6287810776211

DAFTAR LAMPIRAN

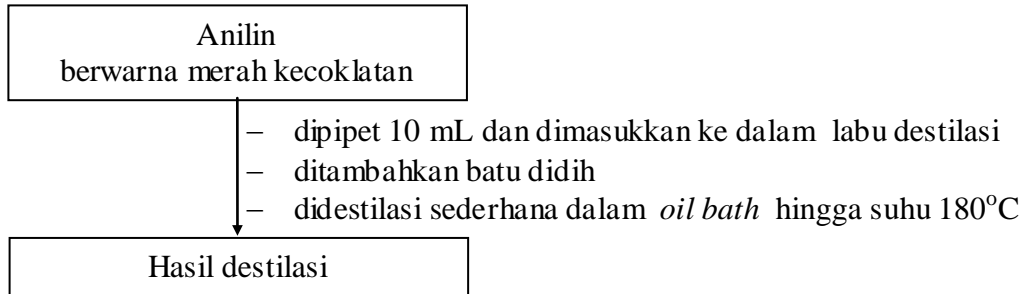
Nomor	Judul	Halaman
A	Skema Kerja	51

"Halaman ini sengaja dikosongkan"

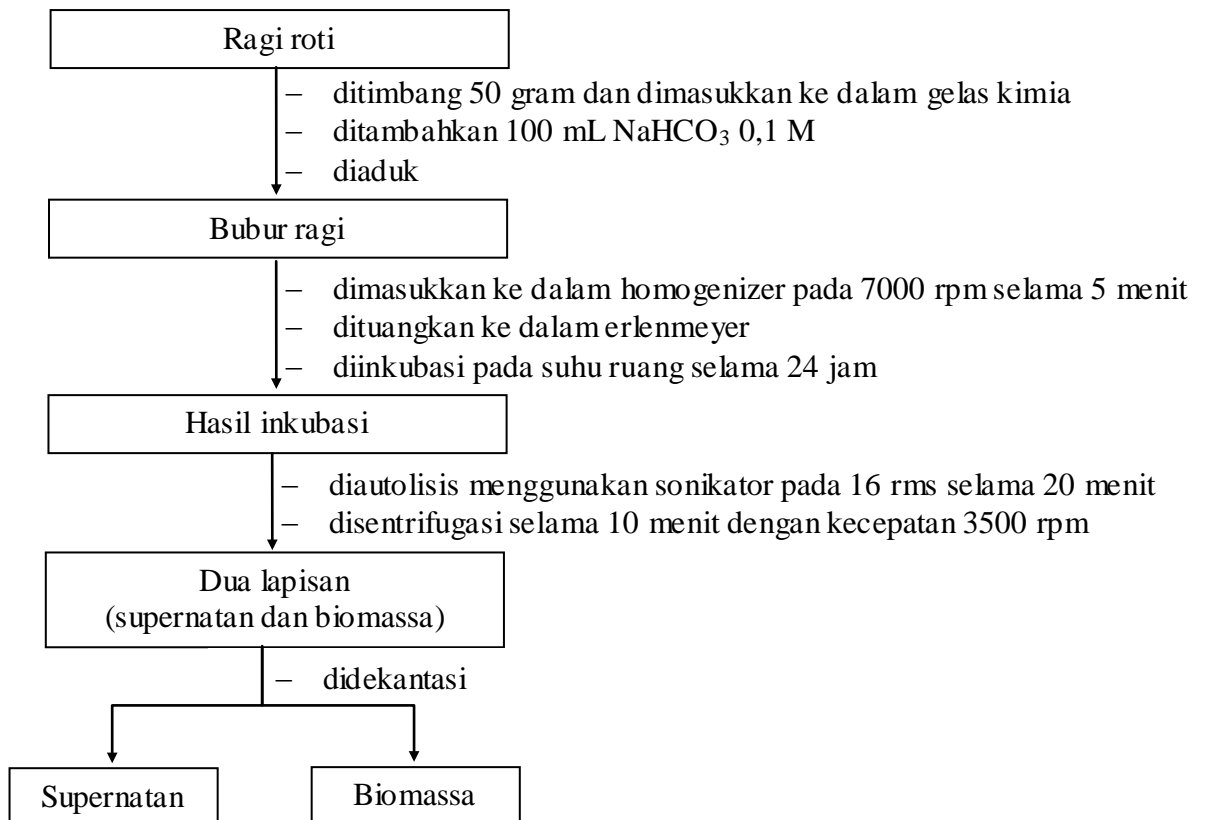
LAMPIRAN

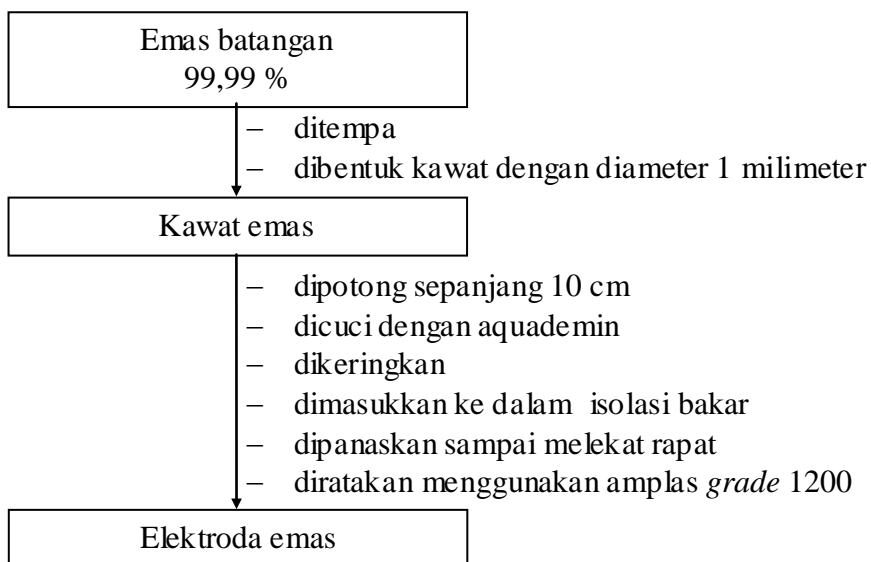
Skema Kerja

1. Pemurnian Anilin



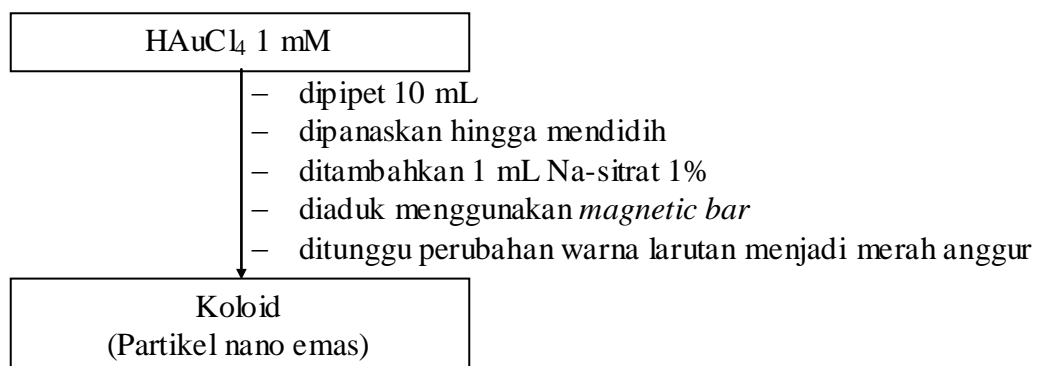
2. Ekstraksi Enzim Invertase dari Ragi Roti





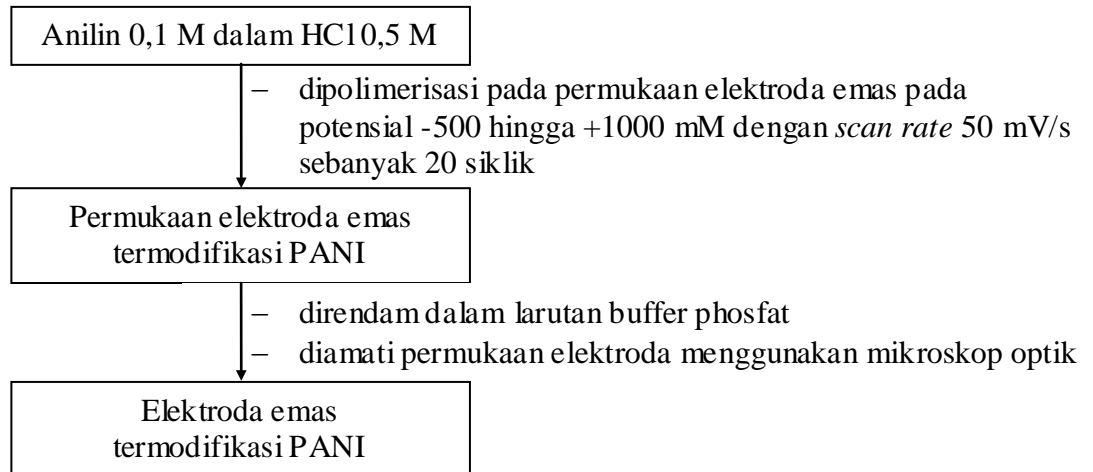
3. Preparasi Elektroda Emas

4. Sintesis Partikel Nano Emas

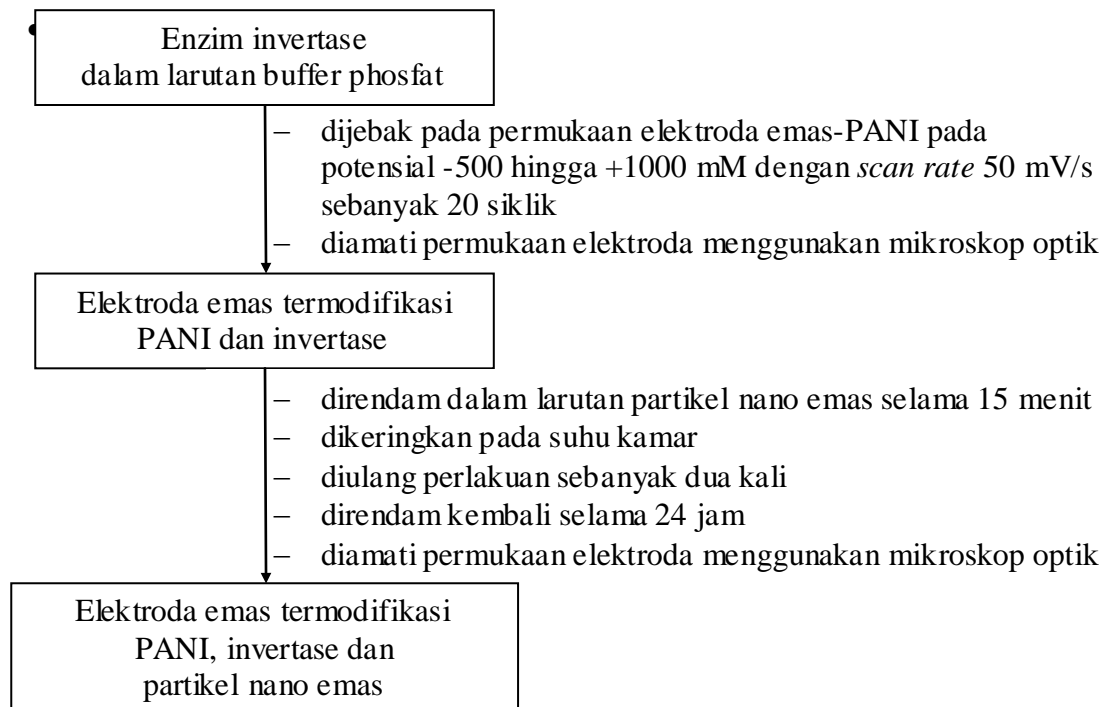


5. Modifikasi Elektroda Emas dengan Polianilin, Enzim Invertase dan Partikel Nano Emas

• Elektropolimerisasi Anilin pada Permukaan Elektroda Emas

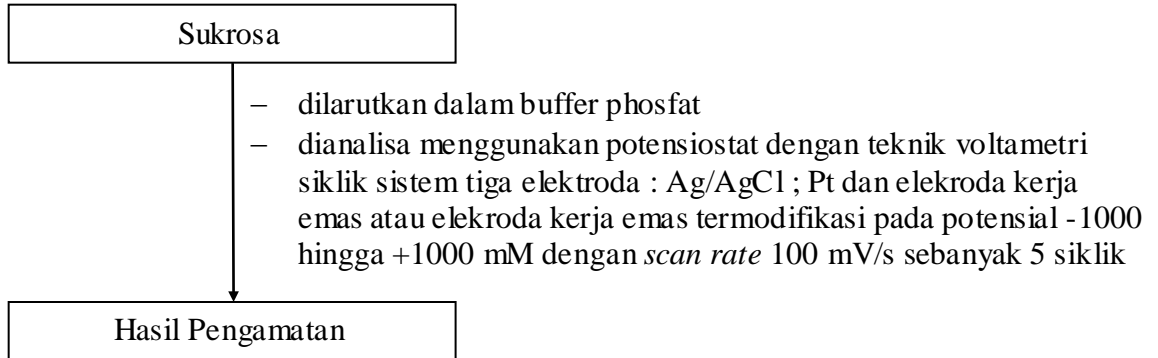


• Penjebakan Invertase dan Deposisi Partikel Nano Emas pada Permukaan Elektroda Emas termodifikasi PANI

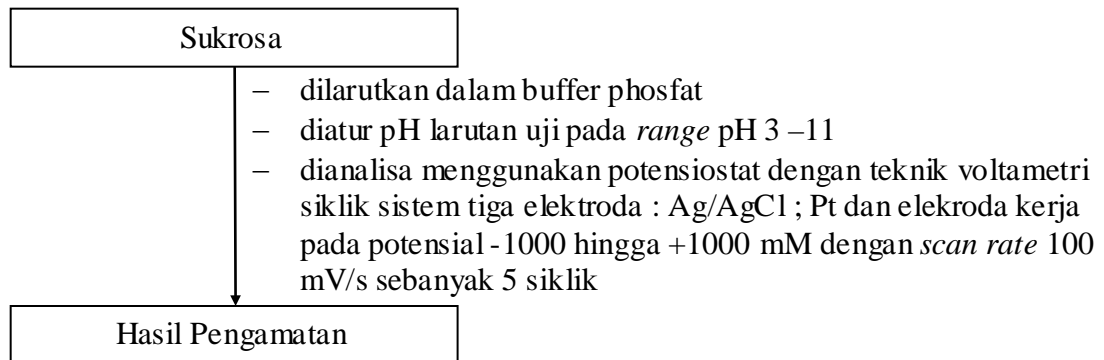


6. Deteksi Sukrosa

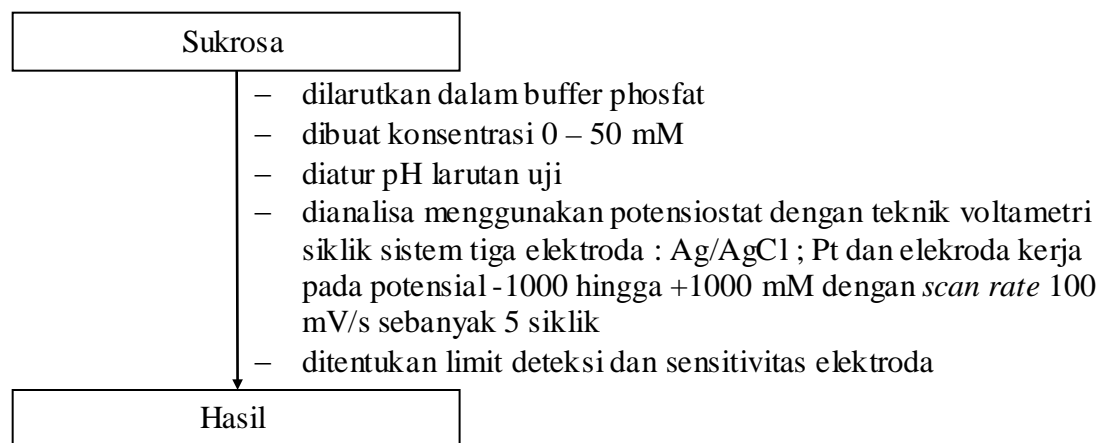
- **Deteksi Sukrosa Menggunakan Elektroda Emas dan Elektroda Emas Modifikasi**



- **Deteksi Sukrosa dengan Variasi pH Larutan Uji**



- **Penentuan Limit Deteksi dan Sensitivitas Elektroda terhadap Sukrosa**



- **Penentuan Selektivitas Elektroda terhadap Fruktosa, Glukosa dan Sukrosa**

