

**PENENTUAN UREA DALAM SERUM DARAH DENGAN
BIOSENSOR KONDUKTOMETRI *Screen Printed Carbon Electrode* (SPCE) –
NATA DE COCO**

**DETERMINATION OF UREA IN BLOOD SERUM BY
CONDUCTOMETRIC BIOSENSOR *Screen Printed Carbon Electrode* (SPCE) –
NATA DE COCO**

**Sendy Kurniawan, Dian Nur Fajariati, Helmi Auliyah Istiqomah, Oki Mandalia
Antasari, Ani Mulyasuryani¹**

Program Studi Kimia FMIPA Universitas Brawijaya
email: ¹mulyasuryani@ub.ac.id

ABSTRAK

Urea merupakan hasil samping degradasi protein pada serum normal berkisar 10,7 sampai 42,8 mg/dL. Biosensor konduktometri untuk penentuan urea dalam serum darah didasarkan pada reaksi hidrolisis urea oleh urease menghasilkan amonia (NH₃) dan karbon dioksida (CO₂) yang terionisasi dalam air. Pada penelitian ini, kondisi optimum dari massa urease, ketebalan membran nata de coco, dan pH larutan urea dipelajari untuk menentukan kinerja biosensor ketika biosensor diaplikasikan untuk sampel serum darah. Biosensor ini dibuat dari SPCE (*Screen Printed Carbon Electrode*) yang dilapisi nata de coco teramobil urease. Pengamatan kinerja biosensor dilakukan pada pH (6; 7; 8; 9), massa urease (0,1; 0,5 ; 1,0; dan 1,5 µg), dan ketebalan membran (5; 10; 15 µm) pada kisaran konsentrasi urea yang 0 hingga 5 ppm dalam buffer fosfat 0,01 M pH 8 dan luas SPCE 5 mm². Hasil penelitian menunjukkan bahwa kinerja optimum dihasilkan pada massa enzim 1 µg; ketebalan membran 5 µm; dan pH larutan 8, dengan kepekaan 14,8 µS/ppm, batas deteksi 0,035 ppm, dan kisaran konsentrasi urea 0,035 ppm hingga 0,4 ppm. Biosensor ini memiliki akurasi 73 – 87% saat diaplikasikan dalam sampel serum darah.

Kata Kunci: Biosensor konduktometri, Membran nata de coco, Urea dalam darah,.

ABSTRACT

Urea is byproduct of protein degradation in normal serum about 10.7 – 42.8 mg/dL. Conductometric biosensor for determination urea in blood serum based on hydrolysis reaction of urea by urease produce ammonia (NH₃) and carbon dioxide (CO₂) which will be ionized in water. The research, optimum condition of urease mass, nata de coco membrane thickness, and pH urea solution were studied for determination performance of biosensor while the biosensor was applied for blood serum sample. The biosensor was made from *Screen Printed Carbon Electrode* (SPCE) which coated nata de coco immobilized urease. Accordingly, various pH (6; 7; 8; 9), urease mass (0.1; 0.5; 1.0; 1.5 µg), and membran thickness (5; 10; 15 µm) was studied in detail with range concentrations of urea solution were 0 to 5 ppm in phosphate buffer 0.01 M pH 8 and SPCE area 5 mm². The result showed that the optimum performance in 1 µg urease mass, 5 µm membrane thickness, and pH solution was 8, whereas the sensitivity was 14.8 µS/ppm, detection limit was 0.035 ppm, and range concentrations of urea were 0.035 to 0.400 ppm. The biosensor have 73 to 87 % accuracy when be applied in blood serum sample.

Keyword: Conductometric biosensor, Nata de coco membrane, Urea in blood.

PENDAHULUAN

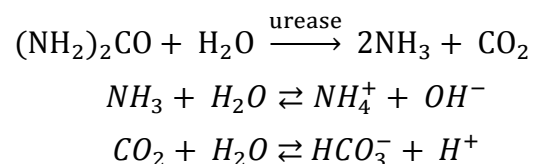
Urea merupakan hasil samping degradasi protein dan komponen utama nitrogen dari urin yang diproduksi di hati dan disaring oleh ginjal (Mei, *et al.*, 2006; Chirizzi and Malitesta, 2011). Peningkatan kadar urea dalam darah (uremia) merupakan gejala penyakit gagal ginjal. Konsentrasi BUN serum normal berkisar 5 sampai 20 mg/dL atau 10,7 sampai 42,8 mg/dL urea (Sacher dan McPherson, 2004). Hasil riset menteri kesehatan tahun 2013 terhadap responden umur ≥ 15 tahun, penyakit gagal ginjal merupakan salah satu penyakit kronis di Indonesia, sehingga perlu dilakukan beberapa tindakan preventif, diawali dengan mengetahui kadar urea dalam darah.

Metode standar yang digunakan untuk pengukuran kadar urea dalam darah yaitu metode spektrofotometri. Metode ini dapat digunakan untuk mengukur konsentrasi urea dalam kisaran normal dan memiliki batas deteksi 10^{-2} ppm (Nazaruddin, 2007). Namun kelemahan metode ini adalah membutuhkan jumlah sampel yang cukup banyak dan tidak dapat digunakan secara luas karena pengoperasian alat tersebut membutuhkan keahlian khusus. Oleh sebab itu diperlukan metode analisis yang lebih cepat dan akurat untuk menganalisis kadar urea dalam darah, yaitu dengan biosensor.

Biosensor urea yang telah dikembangkan saat ini adalah biosensor potensiometri berdasarkan amobilisasi enzim (Nazaruddin, 2007; Chirizzi and Malitesta, 2011; Marchenko, *et al.*, 2015; Mulyasuryani and Srihardiastutie, 2011). Dari hasil penelitian tersebut, diketahui biosensor urea potensiometri memiliki waktu respon yang cepat, namun memiliki kepekaan rendah karena membutuhkan elektroda selektif ion spesifik. Berdasarkan metode tersebut perlu dilakukan pengembangan biosensor urea untuk meningkatkan kepekaan biosensor dengan metode baru yang dapat diaplikasikan pada

sampel serum darah, yaitu biosensor urea konduktometri.

Pada penelitian ini dilakukan inovasi pembuatan biosensor konduktometri untuk mendeteksi urea dalam darah menggunakan SPCE (*Screen Printed Carbon Elektrode*) dan membran nata de coco. Biosensor urea didasarkan reaksi hidrolisis urea oleh urease menghasilkan ion hidronium, ion hidroksil, ion hidrogen karbonat, dan ion amonium yang dapat mengubah daya hantar dalam larutan. Reaksi enzimatik urea oleh urease sebagai berikut (Mulyasuryani, *et al.*, 2010; Marchenko, *et al.*, 2015):



Kinerja biosensor urea dipengaruhi oleh jumlah enzim yang digunakan, ketebalan membran, dan pH. Menurut (Janata, 2009), hasil hidrolisis amonia pada $\text{pH} \geq 9$ menghasilkan ion amonium, hidrolisis karbondioksida pada $\text{pH} \geq 11$ menghasilkan ion bikarbonat dan ion hidronium. Oleh karena itu, pH berpengaruh dalam pengukuran daya hantar larutan karena jumlah ion-ion hasil hidrolisis urea berbanding lurus dengan daya hantar larutan.

Menurut Eggins (2002) reaksi enzimatik berdasarkan persamaan Michaelis-Menten menyatakan bahwa jumlah enzim berbanding lurus dengan laju reaksi. Pada penelitian ini, enzim yang digunakan diamobilkan dalam membran sehingga peningkatan massa enzim teramobil dalam membran berbanding lurus dengan peningkatan laju reaksi enzimatik. Karakteristik enzim sesuai Michaelis-Menten memiliki harga K_M dan V_{maks} . K_M menyatakan konsentrasi substrat saat enzim mencapai setengah kecepatan maksimum) dan V_{maks} merupakan kecepatan reaksi maksimum untuk

menghasilkan produk optimal sesuai persamaan berikut (Gajera, *et al.*, 2008):

$$V = \frac{V_{maks} \times [S]}{K_M + [S]}$$

Pada konsentrasi urea tetap, dan waktu tetap, jumlah urease yang digunakan mempengaruhi potensial urea yang terukur (Kuralay, *et al.*, 2005). Urease yang diamobilkan dalam nata de coco berbanding lurus dengan ketebalan membran. Namun peningkatan ketebalan membran dapat menurunkan kecepatan difusi ion hasil hidrolisis ke permukaan elektroda dalam sehingga menyebabkan membutuhkan waktu lebih lama untuk terdeteksi oleh konduktometer (Mulyasuryani, *et al.*, 2010). Oleh karena itu pada penelitian ini dipelajari pengaruh pH, massa urease, dan ketebalan membran untuk menghasilkan kinerja biosensor konduktometri maksimum dalam menganalisis kadar urea dalam darah.

METODE PENELITIAN

Alat

Peralatan yang digunakan pada penelitian ini di antaranya: alat-alat gelas yang ada di laboratorium, pipet mikro Biohit proline (0,5-10 μ L) dan (20-200 μ L), *microplate*, tabung eppendorf, tabung vacutainer, pH meter senz-pH, blender (Miyako), *Screen Printed Carbon Electrode* (SPCE), vortex, konduktometer.

Bahan

Nata de coco, larutan NaOH 1 M dari NaOH (p.a), larutan buffer fosfat 0,2 M pH 8 dari KH₂PO₄ (merck) dan K₂HPO₄ (merck), larutan buffer fosfat 0,01 M pH 6; 7; 8; dan 9 dari KH₂PO₄ (merck) dan K₂HPO₄ (merck), urease hasil isolasi dari *Schizosaccharomyces pombe* (UGM PAU Pangan & Gizi) dengan kadar protein 82,267 ppm dan aktivitas spesifik 0,25 unit/mL, urea, sampel serum darah (Griya Melati Diagnostik Malang), dan aquademin (Hydrobat)

Preparasi Nata de Coco

Nata de coco dinetralkan hingga pH 7. Setelah itu, nata de coco diblender, disaring dan diperas. Hasil perasan ditimbang 0,1 gram dan dimasukkan ke dalam tabung eppendorf. Selanjutnya ditambahkan buffer fosfat 0,2 M pH 8 dan urease dengan volume total sebanyak 100 μ L, divortex, dan dilapiskan ke SPCE.

Pembuatan dan Pengukuran Kinerja Biosensor

Screen Printed Carbon Electrode (SPCE) diberikan batas menggunakan selotip dengan ukuran lebar 1 mm dan panjang 5 mm. Kemudian masing-masing elektroda dilapisi dengan membran nata de coco hasil vortex untuk dilakukan pengukuran daya hantar urea pada pengaruh ketebalan membran, massa enzim, dan pH.

Pengukuran dilakukan dengan mencelupkan elektroda ke dalam 300 μ L larutan urea. Elektroda dengan enzim dan membran sebagai elektroda kerja dihubungkan ke kutub negatif, sedangkan elektroda pembanding menggunakan SPCE tanpa enzim dan membran dihubungkan ke kutub positif. Pengukuran dilakukan pada massa urease yang ditambahkan 0,1; 0,5; 1; dan 1,5 μ g, ketebalan membran 5 μ m; 10 μ m; dan 15 μ m, dan larutan urea pH 6; 7; 8; dan 9. Masing-masing pengukuran dilakukan sebanyak 2 kali ulangan.

Karakterisasi

Berdasarkan cara kerja 4, dihasilkan kondisi optimum dari biosensor, sehingga kondisi optimum tersebut dilakukan karakterisasi dengan membuat elektroda baru untuk mengetahui kinerja biosensor terbaik. Elektroda dibuat dengan ketebalan membran 5 μ m, massa urease 1 μ g, dan pengukuran larutan urea dilakukan pada pH 8 dengan konsentrasi 0; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; dan 1 ppm dengan volume masing-masing 300 μ L. Data yang diperoleh, dibuat kurva hubungan konsentrasi urea dengan daya hantar untuk

mengetahui kepekaan dan batas deteksi dari biosensor yang telah dibuat.

Analisis sampel serum darah

Sampel serum darah yang diperoleh dari laboratorium klinik (konsentrasi urea telah diketahui), dipipet 10 μL , dimasukkan ke dalam labu ukur 10 mL, ditambahkan larutan urea 5 ppm dengan variasi volume 0; 0,4; 0,8; dan 1,2 mL, kemudian diencerkan dengan buffer fosfat pH 8, 0,01 M hingga tanda batas, dan dikocoh hingga homogen. Hasil pengukuran menggunakan biosensor dibandingkan dengan hasil pengukuran laboratorium klinik.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pengaruh Massa Urease

Pengukuran pengaruh massa urease dilakukan sebanyak tiga kali ulangan pada massa urease 0,1 μg ; 0,5 μg ; 1,0 μg ; dan 1,5 μg . Hasil pengukuran ditunjukkan dalam **Tabel 1**.

Tabel 1. Pengaruh massa urease terhadap kinerja biosensor pada kisaran konsentrasi urea 0 hingga 1 ppm

Massa urease (μg)	Kepekaan ($\mu\text{S/ppm}$)
0,1	2,5
0,5	2,0
1,0	6,0
1,5	1,5

Hasil pengukuran pengaruh massa urease ditunjukkan **Tabel 1**, dihasilkan massa urease optimum pada 1 μg dengan kepekaan 6 $\mu\text{S/ppm}$. Menurut Michaelis-Menten, peningkatan jumlah enzim berbanding lurus dengan kecepatan reaksi sehingga meningkatkan kepekaan biosensor.

Pada massa urease 1,5 μg mengalami penurunan kepekaan menjadi 1,5 $\mu\text{S/ppm}$. Hal ini disebabkan kecepatan reaksi enzim dipengaruhi oleh konsentrasi substrat dan jumlah enzim. Sesuai Michaelis-Menten terdapat kondisi saat enzim mencapai

kecepatan maksimum, massa enzim dan substrat ditingkatkan, maka kecepatan enzim menjadi konstan, sehingga kepekaan menjadi menurun. Selain itu, terdapat kemungkinan terjadi kelebihan enzim menyebabkan difusi hasil reaksi hidrolisis urea menuju elektroda menjadi terhambat, sehingga menurunkan kepekaan biosensor.

Pada massa urease 0,1 μg dan 0,5 μg kepekaan biosensor menghasilkan nilai yang rendah pada tiga kali ulangan yaitu jumlah enzim 0,1 μg memiliki kepekaan 2,5 $\mu\text{S/ppm}$ dan pada 0,5 μg memiliki kepekaan 2 $\mu\text{S/ppm}$. Hal ini disebabkan pada massa urease 0,1 μg dan 0,5 μg menggunakan kondisi yang belum optimum.

Pengaruh pH

Berdasarkan **Tabel 2**, pH optimum diperoleh pada pH 8 ditunjukkan dengan kepekaan paling tinggi. Nilai kepekaan dihasilkan dari nilai kemiringan (a) kurva hubungan konsentrasi urea dengan daya hantar, sehingga diperoleh persamaan garis hubungan daya hantar dengan konsentrasi urea $G = aC + b$.

Tabel 2. Pengaruh pH larutan urea terhadap kinerja biosensor pada kisaran konsentrasi urea 0 hingga 1 ppm

pH larutan	Kepekaan ($\mu\text{S/ppm}$)
6	8,3
7	2,5
8	17,2
9	0,8

Biosensor dipengaruhi oleh pH, karena aktivitas urease dan laju reaksi hidrolisis urea dipengaruhi oleh pH. Maka pH berpengaruh terhadap jumlah ion hasil hidrolisis. Pada kondisi pH optimum (pH 8) memiliki kepekaan yang tinggi. Hal ini disebabkan urease bekerja maksimal sehingga urea dapat terhidrolisis sempurna menjadi ion-ion dan pada saat konsentrasi urea bertambah, daya hantar larutan juga bertambah.

Hasil kepekaan yang tidak sama dalam berbagai pH larutan dikarenakan laju reaksi enzimatik bekerja spesifik pada pH yang sesuai, sehingga jumlah ion-ion hasil hidrolisis urea yang terukur juga berbeda-beda. Maka menghasilkan kepekaan yang berbeda-beda pada setiap pH.

Pengaruh ketebalan membran

Pengaruh ketebalan membran pada pembuatan biosensor dipelajari pada ketebalan 5 μm , 10 μm , dan 15 μm . Hasil pengukuran ditunjukkan **Tabel 3**.

Tabel 3. Pengaruh ketebalan membran terhadap kinerja biosensor pada kisaran konsentrasi urea 0 hingga 1 ppm

Ketebalan Membran (μm)	Kepekaan ($\mu\text{S/ppm}$)
5	0,7
10	0,7
15	-2,7

Hasil pengukuran pengaruh ketebalan membran dihasilkan optimum pada 5 μm . Namun pada ketebalan 10 μm memiliki nilai kepekaan yang sama besar, tetapi konsistensi nilai daya hantar yang dihasilkan lebih rendah daripada ketebalan 5 μm . Hal ini disebabkan membran merupakan jalur difusi ion-ion hasil hidrolisis urea ke permukaan elektroda dalam untuk terdeteksi oleh konduktometer, sehingga tebal membran berbanding terbalik dengan laju difusi ion. Oleh sebab itu, peningkatan tebal membran hingga 15 μm membuat difusi ion-ion hasil hidrolisis urea menuju permukaan elektroda dalam semakin lambat sehingga kepekaan biosensor semakin rendah.

Berdasarkan hasil penelitian dan uraian di atas, maka dihasilkan massa urease optimum adalah 1 μg , pH larutan urea 8, ketebalan membran 5 μm pada kisaran konsentrasi urea 0 hingga 1 ppm untuk luas SPCE 5 mm^2 , sehingga dilakukan karakterisasi.

Karakterisasi

Berdasarkan **Tabel 4**, biosensor konduktometri urea yang telah dibuat memiliki kisaran konsentrasi urea linier pada 0 hingga 0,4 ppm. Hal ini ditunjukkan pada **Tabel 4**, peningkatan daya hantar urea terjadi pada 0 hingga 0,4 ppm.

Tabel 4. Daya hantar urea hasil karakterisasi menggunakan kondisi optimum biosensor

Konsentrasi Urea (ppm)	Daya Hantar (μS)
0,0	248,89
0,1	250,69
0,2	251,65
0,3	254,11
0,4	254,58
0,5	253,71
0,6	247,08
0,7	247,57
0,8	247,42
0,9	246,12
1,0	247,26

Pada konsentrasi urea 0,5 ppm hingga 1 ppm telah mencapai kondisi jenuh, sehingga laju reaksi enzimatik konstan dan tidak berbanding lurus dengan konsentrasi urea. Selain itu, dimungkinkan urease telah lepas dari media amobilisasi, sehingga menyebabkan tidak terjadi perubahan daya hantar pada konsentrasi urea 0,5 hingga 1 ppm.

Pengukuran sampel nyata dengan kisaran konsentrasi 5 hingga 20 mg/dL atau 50 hingga 200 ppm dilakukan pengenceran sebanyak 1000 kali. Untuk batas pemakaian biosensor adalah 5 kali pemakaian. Hal ini dapat dilihat pada **Tabel 4**, konsentrasi urea 0 hingga 0,4 ppm daya hantar yang dihasilkan meningkat sedangkan 0,5 hingga 1 ppm menurun.

Berdasarkan **Tabel 4**, maka diperoleh persamaan matematis hubungan daya hantar dengan konsentrasi urea $G=14,8C + 249$. Berdasarkan persamaan tersebut dihasilkan kinerja biosensor yaitu

kepekaan 14,8 $\mu\text{S/ppm}$ dan batas deteksi 0,035 ppm.

Penentuan urea dalam sampel serum darah

Hasil pengukuran sampel serum darah dengan biosensor konduktometri *Screen Printed Carbon Electrode* (SPCE) – Nata de coco memiliki akurasi 73 hingga 87 %. Persen akurasi tersebut diperoleh dari perbandingan konsentrasi urea yang dihasilkan dari pengukuran menggunakan biosensor dengan hasil laboratorium klinik. Hasil akurasi ini menunjukkan bahwa biosensor urea konduktometri berbasis SPCE – Nata de Coco dapat digunakan sebagai alternatif untuk penentuan urea dalam darah.

KESIMPULAN

Kondisi optimum pembuatan biosensor konduktometri urea dalam sampel serum darah berbasis SPCE – Nata de Coco pada massa urease 1 μg ; ketebalan membran 0,5 μm ; pH larutan uji 8. Pada kondisi tersebut, kinerja biosensor ditunjukkan kepekaan 14,81 $\mu\text{S/ppm}$, batas deteksi 0,035 ppm, dan kisaran konsentrasi urea linier 0,035 hingga 0,4 ppm. Biosensor ini diaplikasikan dalam penentuan urea dalam sampel serum darah memiliki akurasi 73 hingga 87%. Dengan demikian biosensor ini dapat digunakan sebagai alternatif penentuan urea dalam sampel serum darah dan mengurangi ketergantungan Indonesia dengan produk luar negeri,

UCAPAN TERIMAKASIH

Terima kasih kepada DIKTI yang telah memberikan dana hibah untuk penelitian dalam program PKM-P tahun 2015 dan kepada dosen pembimbing yang telah memberikan berbagai saran serta motivasi untuk keberhasilan penelitian ini

DAFTAR PUSTAKA

- Chirizzi, D., and C. Malitesta, 2011, Potentiometric Urea Biosensor Based on Urease Immobilized by an Electrosynthesized Poly(o-phenylenediamine) Film with Buffering Capability, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 157:211-215.
- Eggins, B. R., (2002). *Chemical Sensor and Biosensors*, John Wiley & Sons, Chichester.
- Florinel, G B, (2012). *Chemical Sensors and Biosensors*, John Wiley & Sons, Ltd, United Kingdom.
- Gajera, H. P., S. V. Patel, B. A. Golakiya. (2008). *Fundamentals of Biochemistry A Textbook*, International Book Distributing CO, India.
- Janata, J., (2009). *Principles of Chemical Sensors, Second Edition*, Springer Science, New York.
- Kuralay, F., H. Ozyoruk, dan A. Yildiz, 2005, Potentiometric Enzyme Electrode for Urea Determination Using Immobilized Urease in Poly(vinylferrocenium) Film, *Sensors and Actuators*, B 109, 194-199.
- Marchenko, S. V., I. S. Kucherenko, A. N. Hereshko, I. V. Panasiuk, O. O. Soldatkin, A. V. El'skaya, and A. P. Soldatkin, 2015, Application of Potentiometric Biosensor Based on Recombinant Urease for Urea Determination in Blood Serum and Hemodialyzate, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 207:981-986.
- Mei, K. S., L. Y. Heng, and M. Ahmad, 2006. Pemegunan Enzim Urease dalam Bahan Hidrogel Metakrilat untuk Menghasilkan Membran Biosensor Urea, *Jurnal Teknologi*, 45:53-66.
- Mulyasuryani, A., A. Roosdiana, and A. Srihardyastutie, 2010, The Potentiometric Urea Biosensor

- using Chitosan Membrane, *Indo. J. Chem.*, vol. 10, no. 2, pp 162-166.
- Mulyasuryani, A., and A. Srihardiastutie, 2011, Conductimetric Biosensor for the Detection of Uric Acid by Immobilization Uricase on Nata de Coco Membrane-Pt Electrode, *Analytical Chemistry Insight*, pp. 47-51.
- Nazaruddin, 2007, Biosensor Urea Berbasis Biopolimer Khitin sebagai Matriks Immobilisasi, *Jurnal Rekayasa Kimia dan Lingkungan*, vol. 6, no. 1, pp. 41-44.
- Sacher, R. A. dan R. A. McPherson, (2004). *Tinjauan Klinis Hasil Pemeriksaan Laboratorium, Edisi 11*, (Diterjemahkan oleh: dr. Brahm U. Pendit dan dr. Dewi Wulandari), Buku Kedokteran EGC, Jakarta.