

Deskripsi

BIOSENSOR ASAM LEMAK DENGAN MENGGUNAKAN ENZIM LYPOXYGENASE

5 **Bidang Teknik Invensi**

Invensi ini berhubungan dengan modifikasi sistem elektrokimia yang terdiri dari dua atau tiga elektroda, yaitu elektroda kerja berupa elektroda enzim di-imobilisasi, elektroda acuan dan atau elektroda cacah yang dapat dikemas menjadi chip atau strip sehingga juga dapat diterapkan pada sistem pengukuran elektrokimia.

Latar Belakang Invensi

Biosensor didefinisikan sebagai suatu perangkat sensor yang menggabungkan senyawa biologis (misalnya mikroorganisme, enzim, antibodi dan lain-lain) dengan suatu transduser (elektroda biosensor). Prinsip dasar biosensor adalah komponen-komponen biologi aktif mendeteksi analit target dengan transduser yang menghasilkan signal elektronik yang dapat diukur, signal ini tergantung pada tipe transdusernya. Biosensor merupakan instrumen analisis yang sangat penting karena mempunyai daya analisis sangat selektif dan sensitif terhadap analit target sehingga dapat menentukan kadar senyawa pada konsentrasi sangat rendah. Komponen biologis yang dapat dipergunakan untuk pengembangan biosensor cenderung menggunakan enzim karena spesifiknya terhadap substrat.

Enzim bekerja sebagai senyawa aktif akan berinteraksi dengan molekul substratnya atau yang disebut molekul sasaran.

Hasil interaksi yang berupa besaran fisik seperti panas, arus listrik, potensial listrik atau lainnya akan dimonitor oleh transduser. Besaran tersebut kemudian diproses sebagai sinyal. Elektroda Biosensor dianalisis dengan metode amperometri
5 didasarkan pada pengukuran arus (I) dalam sel elektrokimia sedangkan pengukuran potensiometri didasarkan pada pengukuran potensial (E) didalam elektrolit.

Biosensor yang pertama kali dibuat adalah sensor yang menggunakan transduser elektrokimia yaitu elektroda enzim untuk
10 menentukan kadar glukosa dengan metode amperometri. Sejauh ini, biosensor dalam perkembangannya mempunyai tiga generasi yaitu generasi pertama; dimana biosensor berbasis oksigen, generasi kedua; biosensor menjadi lebih spesifik yang melibatkan "mediator" diantara reaksi dan transduser, dan terakhir generasi
15 ketiga; dimana biosensor berbasis enzyme coupling. Produk-produk komersial dari teknologi biosensor, sekarang ini telah banyak diperjualbelikan. Biosensor eksternal/internal dalam bentuk chip bahkan telah diproduksi oleh perusahaan Amerika i-Stat, MicroChips, Digital Angel, VeriChip yang dapat ditanam dalam
20 tubuh manusia. Beberapa Perusahaan Jepang pun turut berpartisipasi, seperti Matsushita Electric Industrial Co. dengan teknologi biosensornya yang mampu menetapkan secara cepat dan mudah pengukuran kolesterol darah. Tokyo Medical and Dental University dengan biosensor nafasnya yang memanfaatkan enzim
25 monoamine oksidase A (MAO A) dan lain sebagainya. Tetapi secara umum untuk pengguna biosensor, hampir 60% pengunanya berasal dari health-care industri.

Hasil penelusuran paten yang berkaitan dengan biosensor, khususnya yang menggunakan enzim menunjukkan beberapa hasil
30 sebagai berikut. Paten EP0847447B1 tahun 1996 menjelaskan tentang preparasi biosensor yang mengandung bahan konduktif

dalam bentuk bubuk atau butiran; senyawa biosensor; bahan pengikat (binder). Bahan pengikat pengikat padat, yang merupakan senyawa dalam bentuk padat pada suhu kamar, yang dipilih dari kelompok senyawa kimia yang terdiri dari:

5 hidrokarbon jenuh atau tak jenuh, yang mengandung dari 12 hingga 60 atom karbon, lebih disukai dari 12 hingga 30 atom karbon, secara opsional disubstitusi dengan sekurang-kurangnya suatu kelompok yang dipilih dari -OH, -SH, -NH₂, -CO-, -CHO, -SO₃H, -COOH, -OR₁, -SR₁, -NR₁R₂ dan -COOR₁, dimana R₁ dan R₂ merupakan

10 gugus hidrokarbon, secara opsional mengandung satu atau lebih heteroatom; ester dari asam lemak dengan gliserol; dan ester dari asam lemak dengan kolesterol.

Uraian tentang pembuatan biosensor yang memasukkan ekstraksi / isolasi enzim, pembuatan elektroda dengan sistem

15 pengukuran elektrokimia dua atau tiga probe pada micro-amperemeter atau potensiostat belum dipatenkan sebelumnya.

Uraian Singkat Invensi

Sebagai invensi utama adalah metode pembuatan biosensor asam lemak dengan menggunakan enzim lyxoyxygenase. Biosensor

20 merupakan salah satu tipe perangkat sensor yang menggabungkan senyawa biologis dan transduser yang dibuat sebagai detektor elektrokimia / elektronik. Proses pembuatan biosensor asam lemak dilakukan secara tiga tahap, 1) mengisolasi enzim lyxoyxygenase,

25 2) mengimobilisasi enzim lyxoyxygenase pada matriks maaterial konduktif atau membuat elektroda dan 3) membuat biosensor. Imobilisasi merupakan langkah penting karena sangat mempengaruhi kinerja biosensor. Imobilisasi diharapkan dapat mengurangi kehilangan material aktif, enzim selama pengaplikasiannya;

30 menjaga stabilitas enzim sehingga masa pakai biosensor makin

lama, dan waktu respon lebih singkat serta mudah untuk dipasangkan dengan sensor tertentu.

Uraian Lengkap Invensi

5 Aplikasi biosensor pada dasarnya meningkat seiring dengan berkembangnya keperluan manusia dan kemajuan iptek. Secara umum aplikasinya adalah untuk bidang medis dan lingkungan hidup. Beberapa bidang aplikasi lainnya adalah sebagai berikut: mengontrol penyakit seperti diabetes, kolesterol, jantung;
10 diagnosis seeperti metabolit, enzim, vitamin; penyakit infeksi, alergi; studi efisiensi obat; kontrol polusi; monitoring senyawa-senyawa toksik di udara, air, dan tanah; penentuan BOD (*biological oxygen demand*); mengontrol kualitas makanan (mendeteksi kontaminasi) seperti mikroba, menentukan kesegaran,
15 analisis lemak, protein dan karbohidrat dalam makanan; mendeteksi kebocoran, menentukan lokasi deposit minyak; mengecek kualitas udara di ruangan; penentuan parameter kualitas pada susu; mengontrol kualitas tanah; penentuan degradasi seperti biodegradable pada kayu dan makanan; mendeteksi keberadaan
20 pestisida; mendeteksi zat-zat kimia dan biologi yang digunakan sebagai senjata perang (senjata kimia/biologi) seperti virus, bakteri patogen, dan gas urat syaraf. Metoda yang diterapkan pada invensi ini terdiri dari 1) mengisolasi enzim lyoxygenase, 2) mengimobilisasi enzim lyoxygenase pada matriks mterial
25 konduktif atau membuat elektroda dan 3) membuat biosensor.

Lyoxygenase dapat ditemukan pada tumbuhan, hewan dan jamur. Kandungan terbanyak lyoxygenase terdapat pada kacang -
kacangan sehingga lyoxygenase dapat diekstrak dari kacang-
kacangan, seperti kacang tanah, kacang hijau dan kacang merah.
30 Pada kacang kedelai, dalam 1 mg tepungnya terdapat satu juta

unit enzim lipoxygenase. Isolasi lipoxygenase dari kacang dapat dilakukan dengan membuat serbuk kacang terlebih dahulu. Pada tahap mengisolasi enzim lipoxygenase dilakukan adalah menggiling kacang kedelai hingga menjadi serbuk, dilanjutkan dengan menekan serbuk kacang kedelai pada alat press hidrolik pada tekanan 300 kg/cm^2 untuk membuang cairan dalam kacang kedelai. Serbuk yang telah dipress kemudian disaring hingga lolos saringan 60 mesh. Hasil saringan dihilangkan lemaknya dengan perendaman pada campuran kloroform-ethanol (2:1), dengan perbandingan sampel-pelarut 1:10 dan disaring kembali serta dikeringkan. Sampel tepung kacang kedelai yang telah kering telah bebas lemak disimpan pada temperatur berkisar $4 \text{ }^\circ\text{C}$ hingga digunakan pada tahap ekstraksi. Pada tahap ekstraksi, tepung kacang kedelai bebas lemak sebanyak 20 gram dihomogenkan dalam 400 mL akuades, lalu diaduk menggunakan pengaduk magnetik selama 1 jam pada temperatur berkisar $4 \text{ }^\circ\text{C}$. Supernatan (ekstrak enzim kasar) dipisahkan menggunakan sentrifugasi pada 3000 rpm selama 20 menit. Ekstrak kasar yang didapat berkisar 16-20 mL/g dengan aktivitas sebesar 1460 unit/mL.

Tahap pembuatan elektroda atau mengimobilisasi enzim lipoxygenase pada matriks material konduktif. Metoda immobilisasi yang dapat digunakan misalnya pembentukan ikatan menyambung-silang (*cross-link*) oleh senyawa glutaraldehid. Senyawa ini akan membentuk suatu lapisan atau matriks tertentu dimana di dalamnya biomolekul, misalnya enzim yang dioleskan pada permukaan elektroda akan terjebak dalam struktur ikatan silang yang terjadi. Keunggulan metode ini adalah enzim terikat secara kuat, sehingga sulit terlepas dari material pendukung. Pada tahap ini dilakukan pengendapan dengan menggunakan larutan ammonium sulfat padat. Campuran kemudiann didiamkan semalaman pada temperatur 4°C . Endapan dipisahkan dengan cara

disentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm selama 20 menit menghasilkan endapan berupa enzim dalam matriksnya. Endapan enzim yang diperoleh dari hasil pengendapan ammonium sulfat dilakukan dialisis. Endapan enzim dilarutkan dalam buffer fosfat pH 7, lalu dimasukkan ke dalam kantung selofan, diikat dan direndam buffer fosfat pH 7, diaduk dengan menggunakan stirrer selama 8 jam pada suhu 4 °C pada 4 jam pertama, setiap jam larutan diganti. Larutan dialisis diuji dengan BaCl₂ untuk memastikan garam sulfat dan pengotor lainnya telah keluar dari larutan enzim. Enzim telah bebas dari pengotor, kemudian dilakukan immobilisasi enzim. Untuk mengimobilisasi enzim terlebih dahulu disiapkan potongan aluminium dengan ketebalan minimal 1mm. Pada pelat dioleskan secara merata bahan pengikat (*binder*). Bahan pengikat yang digunakan dapat berupa polymer konduktif seperti polyether etherketone, poli-aniline, polypyrrole, polyallylamine, polyethyleneimine, atau polymer non-konduktif, seperti polymethyl-methacrylate, polyurethane, polyvinylidene fluoride, polytetrafluoro-ethylene atau kombinasi polimer - polimer tersebut. Pelat tersebut langsung dilapisi merata dengan ekstrak lyxooxygenase 1 mL, dilanjutkan dengan melapisi bahan aktif permukaan (*surfactant*) pada elektroda. Bahan aktif permukaan yang dapat digunakan seperti trietanolamin, etilenglikol, propilen karbonat. Elektroda didiamkan di dalam bejana tertutup sampai kering dalam desikator. Hasil berupa elektroda enzim terimmobilisasi pada permukaan aluminium sebagai elektroda kerja.

Pada tahap pembuatan biosensor disiapkan tiga elektroda untuk bekerja secara elektrokimia. Elektroda yang mengandung lyxooxygenase merupakan transduser, yang mengantar muatan yang terjadi akibat reaksi kimia enzim dan substratnya. Proses yang terjadi dalam transduser dapat berupa calorimetric biosensor,

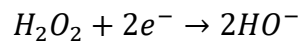
potentiometric biosensor, amperometric biosensor, optica biosensor maupun piezoelectric biosensor. Sinyal yang keluar dari transduser ini kemudian di proses dalam suatu sistem elektronik misalnya recorder atau komputer.

5 Enzim terimmobilisasi (elektroda kerja) dikontakkan dengan asam lemak secara setengah sel pengukuran amperometrik dua probe maupun tiga probe. Pada sistem elektrokimia setengah sel dua probe, satu probe dikontakkan dengan elektroda enzim terimmobilisasi, sebagai elektroda kerja dan satu lagi dengan
10 Ag/AgCl, sebagai elektroda acuan; sebaliknya pada sistem elektrokimia tiga probe, satu probe dikontakkan dengan elektroda enzim terimmobilisasi, Ag/AgCl pada probe elektroda acuan, logam Pt atau Au atau paduan Pt atau paduan Au pada probe elektroda cacah. Sistem elektrokimia dua probe dapat dilakukan pada
15 peralatan microampermeter; sedangkan sistem elektrokimia tiga probe dilakukan pada peralatan potensiostat.

Elektroda enzim terimmobilisasi dimasukkan ke dalam tabung polyethylene atau flexiglass yang dibatasi oleh tabung polyethylene atau flexiglass yang lebih kecil diameternya.
20 Sebanyak beberapa tetes larutan KCl 100 mM dimasukkan ke dalam tabung luar yang kontak dengan elektroda acuan melalui lubang kecil yang dibuat pada bagian atas tabung luar. Sedangkan elektroda kerja diletakkan pada dasar (bagian paling bawah) dari tabung dalam dengan enzim terimmobilisasi menghadap ke luar atau
25 terkena kontak dengan cairan / larutan yang mengandung asam lemak. Sebaliknya, bahan pendukung dapat dihubungkan dengan probe menggunakan kawat yang diletakkan ditengah - tengah tabung dalam. Bagian atas sel ditutup dengan epoksi dengan menyisakan sebagian kecil kawat probe dan kedua tabung tersusun tanpa
30 tersentuh satu dengan lainnya. Enzim terimmobilisasi merupakan satu-satunya bagian dari sel yang kontak dengan larutan

elektrolit. Larutan elektrolit dapat dibuat dari campuran NaCl 0,5 M, buffer phosphate 0,1 M (pH 7) dan asam lemak. Pengukuran kemudian dapat dilakukan setelah sel elektroda dicelupkan ke dalam larutan elektrolit.

5 Pengukuran dilakukan secara amperometri. Amperometri menggunakan beda potensial (tegangan) konstan yang diaplikasikan pada elektroda kerja, dan arus diukur sebagai fungsi waktu. Penerapan tegangan tersebut menyebabkan terjadi reaksi reduksi oksidasi. Sensor amperometri yang pertama dikembangkan untuk
10 mendeteksi oksigen dalam darah yang melibatkan reaksi enzimatis dalam tubuh. Sensor amperometri dari proses enzimatis yang juga banyak dikenal adalah sensor glukosa dalam darah. Pada dasarnya tubuh banyak menghasilkan H₂O₂ sebagai hasil sampingan dari proses enzimatis terutama yang melibatkan reaksi reduksi. Dengan
15 adanya elektron yang membawa muatan listrik dari bedapotensial yang diterapkan, maka peroksida tersebut akan direduksi kembali menjadi hidroksida.

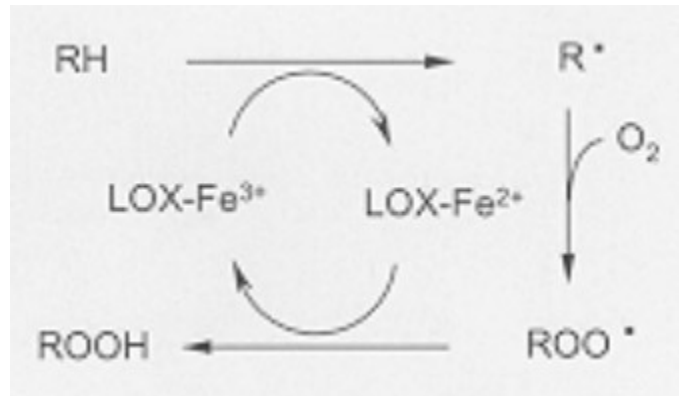


Peroksida hasil dari katalisasi oleh enzim lyoxygenase diukur dengan metode amperometri sebagai uji aktivitas
20 biosensor. Peroksida yang tereduksi pada katoda platina akan bersesuaian dengan arus yang terbaca pada alat dimana kenaikan arus berbanding lurus dengan konsentrasi peroksida yang terbentuk.

Pada reaksi antara asam lemak dan lyoxygenase dihasilkan
25 peroksida asam lemak. Pada lemak, oksidasi dari lemak yang mengandung asam lemak poli-tak-jenuh (*polyunsaturated*) menghasilkan lemak hidroperoksida. Reaksi ini dapat dikatalisis oleh lyoxygenase. Lyoxygenase mengandung satu unit besi per molekul enzim. Lyoxygenase-Fe⁺³ dari enzim bertanggung jawab

atas terbentuknya radikal pentadienil ($R\cdot$). Spesi $R\cdot$ kemudian bereaksi dengan O_2 dan $\cdot H$ membentuk $ROOH$. Skema reaksi tersebut adalah sebagai berikut.

5



10 Fungsi dari lyxoxygenase (LOX) beragam, salah satunya adalah mengkatalis asam lemak. Salah satu jenis asam lemak, yang banyak berhubungan dengan lyxoxygenase adalah asam linoleat. Asam linoleat merupakan jenis asam lemak poli-tak-jenuh (*polyunsaturated*), dengan adanya oksigen dan dikatalis oleh
15 enzim lyxoxygenase, sehingga dihasilkan peroksida linoleat. Hasil tersebut diukur dengan metoda amperometri.

Selain asam linoleat terdapat beberapa asam lemak tidak jenuh lainnya yang dapat ditemukan secara alamiah, yaitu asam miristoleat, asam palmitoleat, asam sapienat, asam oleat, asam
20 elaidat, asam vaksenat, asam linoleat, asam linoelaidat dan asam α -linoleat. Asam lemak tak jenuh mempunyai satu atau lebih ikatan rangkap antara atom karbon. Dua atom karbon yang terikat pada atomatom karbon yang berikatan rangkap satu sama lain mempunyai konfigurasi cis-trans. Konfigurasi cis berarti atom
25 hidrogen berada dalam sisi yang sama pada atom karbon ikatan rangkap. Kekakuan ikatan rangkap membekukan konformasinya. Konfigurasi cis menyebabkan bengkoknya rantai dan mencegah bebasnya asam lemak untuk berkonformasi. Ikatan rangkap

konfigurasi cis mempunyai fleksibilitas yang rendah. Asam lemak tak jenuh yang mempunyai ikatan konfigurasi cis disebut dengan lemak cis.

5 Konfigurasi trans berarti atom hidrogen berada dalam sisi yang berseberangan pada atom karbon berikatan rangkap. Asam lemak tak jenuh dengan konfigurasi trans tidak terlalu bengkok, dan bentuknya hampir sama dengan asam lemak jenuh. Asam lemak dengan konfigurasi trans disebut lemak trans. Pada asam lemak tak jenuh alami, masing-masing ikatan rangkap mempunyai tiga
10 atom karbon yang berikatan rangkap cis. Sebagian besar asam lemak yang mempunyai konfigurasi trans (lemak trans) tidak terdapat di alam.

Klaim

1. Metoda pembuatan biosensor asam lemak yang menggunakan enzim lyxoygenase dengan tahap - tahap, sebagai berikut, mengisolasi enzim lyxoygenase, terdiri dari dari
 - 5 - menggiling kacang kedelai hingga menjadi serbuk;
 - menekan serbuk kacang kedelai pada alat press hidrolik pada tekanan 300 kg/cm².
 - menyaring serbuk sehingga lolos saringan 60 mesh
 - menghilangkan lemak dengan perendaman pada campuran kloroform-ethanol (2:1), dengan perbandingan sampel-
10 pelarut 1:10
 - disaring kembali serta dikeringkan.
 - disimpan pada temperatur rendah (0 - 4 °C);
 - membuat ekstrak kasar (supernatan) yang mengandung enzim
15 lypo-oxyengenase.

meng-immobilisasi enzim atau membuat elektroda enzim, terdiri dari

 - melapisi pelat aluminum dengan bahan pengikat secara tipis;
 - 20 - melapisi ekstrak murni lyxoygenase secara tipis pada permukaan polyaniline di pelat aluminum;
 - mengolesi bahan aktif permukaan (*surfactant*);
 - dikeringkan dalam desikator.

pembuatan sel biosensor, terdiri dari

 - 25 - menyiapkan 2 tabung polyethylene atau flexi glass yang berbeda diameternya.
 - Pengukuran elektrokimia dengan elektroda enzim terimobilisasi dapat dilakukan dengan menggunakan 2 atau 3 probe.
 - 30 - memasukkan 100 mM larutan KCl ke dalam tabung luar yang kontak dengan elektroda;

- menutup bagian atas sel dengan menggunakan epoksi sehingga menyisakan sebagian kecil kawat probe.
- Pengukuran

5 2. Bahan pengikat sesuai klaim 1, dapat berupa polymer konduktif seperti polyether etherketone, poli-aniline, polypyrrole, polyallylamine, polyethyleneimine, atau polymer non-konduktif, seperti polymethyl-methacrylate, polyurethane, polyvinylidene fluoride, polytetrafluoro-
10 ethylene atau kombinasi polimer - polimer tersebut.

3. Bahan aktif permukaan sesuai klaim 1, dapat berupa trietanolamin, etilenglikol, propilen karbonat.

15 4. Sistem elektrokimia 2 probe sesuai klaim 1, dilakukan dengan meletakkan elektroda enzim terimobilisasi sebagai probe elektroda kerja diletakkan pada dasar (bagian paling bawah) dari tabung polyethylene atau flexi glass; elektroda Ag/AgCl diantara dua tabung sebagai probe elektroda acuan;
20 pengukuran dilakukan dengan peralatan microamperemeter.

5. Sistem elektrokimia 3 probe sesuai klaim 1, dilakukan dengan meletakkan elektroda enzim terimobilisasi sebagai probe elektroda kerja diletakkan pada dasar (bagian paling bawah) dari tabung polyethylene atau flexi glass; elektroda Ag/AgCl diantara dua tabung sebagai probe elektroda acuan; elektroda Pt atau Au atau paduan Pt atau paduan Au ditempatkan cukup dekat dengan elektroda cacah; pengukuran dilakukan dengan peralatan potensiostat.

Abstrak

BIOSENSOR ASAM LEMAK DENGAN MENGGUNAKAN ENZIM LYPOXYGENASE

Invensi ini berhubungan dengan modifikasi sistem elektrokimia yang terdiri dari dua atau tiga elektroda, yaitu elektroda kerja, cacah dan atau acuan yang dapat dikemas menjadi chip atau strip sehingga juga dapat diterapkan pada sistem pengukuran. Proses pembuatan biosensor asam lemak dilakukan secara tiga tahap, 1) mengisolasi enzim lyxygenase, 2) mengimobilisasi enzim lyxygenase atau membuat elektroda pada matriks maaterial konduktif dan 3) membuat biosensor. Pengukuran dapat dilakukan pada sistem elektroda 2 probe maupun 3 probe. Pada sistem elektrokimia 2 probe elektroda enzim di-imobilisasi bertindak sebagai elektroda kerja dan sebagai elektroda acuan adalah strip Ag/AgCl, pengukuran dapat dilakukan pada micro-amperemeter. Sedangkan pada sistem pengukuran 3 probe digunakan elektroda enzim di-imobilisasi sebagai elektroda kerja, strip Ag/AgCl dan elektroda cacah adalah strip Pt atau Au atau paduan Pt atau paduan Au. Keberadaan asam lemak dideteksi dengan keberadaan perubahan arus listrik (ampere). Uraian tentang pembuatan biosensor yang memasukkan ekstraksi / isolasi enzim, pembuatan elektroda dengan sistem pengukuran elektrokimia dua atau tiga probe pada micro-amperemeter atau potensiostat belum dipatenkan sebelumnya.