

BIOSENSOR UREA BERBASIS UREASE DARI BIJI KACANG TOLO (*Vigna unguiculata ssp unguiculata* L.)

UREA BIOSENSOR BASED ON UREASE FROM BLACK-EYED PEA (*Vigna unguiculata ssp unguiculata* L.)

Zusfahair, Dian Riana Ningsih, Amin Fatoni, Vika Aprillia Puspitarini

Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Jenderal Soedirman, Purwokerto
53123, Indonesia.

Email: zusfahair@gmail.com

ABSTRAK

Penggunaan urease dalam analisis urea yang digabungkan dengan suatu transduser disebut biosensor urea. Tujuan penelitian adalah menentukan kadar urea dengan metode biosensor urea berbasis urease biji kacang tolo yang diamobilisasi pada matrik alginat dan dideteksi secara kolorimetri menggunakan indikator bromtimol biru. Penelitian dimulai dengan isolasi urease dari kacang tolo, kemudian diamobilisasi menggunakan metode penjebakan dengan natrium alginat, setelah mencampur larutan urease dengan natrium alginat, ditetaskan dalam larutan CaCl_2 sampai terbentuk urease alginat. *Beads* urease alginat direaksikan dengan urea menghasilkan ion amonium, selanjutnya ditambahkan indikator bromtimol biru dan perubahan warnanya diukur menggunakan spektrofotometer. Kinerja analitis biosensor urea ditentukan melalui penentuan waktu reaksi enzimatik, linearitas, batas deteksi dan batas kuantifikasi, keberulangan analisis, keberulangan pembuatan dan pengujian senyawa pengganggu. Hasil penelitian menunjukkan *beads* urease alginat bisa digunakan berulang sampai 8 kali. Kinerja analitis *beads* urease alginat menghasilkan respon yang linier pada rentang 0,05 mM - 15 mM dengan koefisien korelasi sebesar 0,9981, batas deteksi sebesar 0,8 mM dan batas kuantifikasi sebesar 2,67 mM. Keberulangan pembuatan *beads* urease alginat menghasilkan nilai koefisien variasi sebesar 6%. Analisis tidak terganggu dengan keberadaan asam askobat 0,05 mM dan asam urat 0,4 mM.

Kata kunci: amobilisasi urease, *beads* alginat, biosensor, biji kacang tolo, spektrofotometri.

Abstract

The use of urease in the urea analysis which combined with a transducer is called urea biosensor. Research aimed to determine urea level using urea biosensor method based on urease from black-eyed pea that immobilized on alginate matrix and detected by colorimetric using bromothymol blue indicator. The research began with urease isolation from black-eyed pea, and then it immobilized utilizing the trapping method with sodium alginate, after mixing urease solution with sodium alginate, it is dripped in CaCl_2 solution until alginate urease beads formed. Alginate urease beads reacted with urea to produce ammonium ion, then it's added with indicator bromothymol blue, and the color changes were measured using a spectrophotometer. Enzymatic reaction time, linearity, limit of detection and limit of quantification, repeated analysis, repeatability of fabrication and calibration of disturbing compounds determined the analytical performance of urea biosensor. The results showed that alginate urease beads could repeatedly be used until eight times. The analytical performance of alginate urease beads including a linear response in the range of 0.05 mM-15 mM with the correlation coefficient of 0.9981, the detection limit of 0.8 mM and the quantification limit of 2.67 mM. The repeatability of fabrication alginate urease

beads produced the coefficient of variation value of 6%. The presence of 0.05 mM ascorbic acid and 0.4 mM uric acid was not disrupted the analysis.

Keywords: urease immobilization, alginate beads, biosensor, black-eyed pea, spectrophotometry.

1. PENDAHULUAN

Urea adalah salah satu produk metabolisme protein. Kadar urea meningkat dalam darah menunjukkan adanya penyakit ginjal, batu di saluran kemih atau bahkan tumor kandung kemih, sedangkan kadar urea yang rendah menunjukkan adanya kerusakan yang parah pada hati. Kadar normal urea dalam serum berkisar dari 15 mg / dL sampai 45 mg / dL (2,5 mM sampai 6,7 mM) (Saeedfar, Heng, Ling, & Rezayi, 2013). Analisis kadar urea dalam darah secara rutin penting dilakukan untuk mengetahui kondisi fungsi organ-organ tersebut.

Penggunaan senyawa biologis (enzim) dalam analisis urea yang digabungkan dengan suatu transduser dikenal dengan nama biosensor. (Dindar, Karaku, & Abas, 2011) melakukan analisis urea menggunakan biosensor. Prinsip kerja biosensor adalah berdasarkan amobilisasi dari suatu komponen biologi (enzim, bakteri, dan lain – lain) pada matriks membran polimer yang diintegrasikan dengan sinyal transduser pada analit. Biosensor menghasilkan suatu sinyal elektrik yang proporsional terhadap konsentrasi analit (Yi et al., 2014).

Pengembangan matrik pendukung amobilisasi enzim juga merupakan aspek penting dari biosensor, karena terkait dengan aktivitas dan pemakaian berulangannya yang akan berpengaruh pada nilai ekonomis cara analisis dengan biosensor ini. Untuk penentuan urea, biosensor berdasarkan enzim urease bisa digunakan. Beberapa peneliti telah melakukan penelitian mengenai penentuan kadar urea menggunakan enzim urease yang diamobilisasi menggunakan berbagai matrik pendukung. Amobilisasi urea telah dilakukan menggunakan matrik pendukung kitosan yang diikat silang dengan glutaraldehid (Andrich, Esti, & Moresi, 2010); ZnO (Eghbali & Farahbakhsh, 2015); nanomaterial fullerene (Saeedfar et al., 2013); nilon (Verma, Kumar, & Sachin, 2012).

Pada makalah ini dilakukan amobilisasi enzim urease dari biji kacang tolo menggunakan matrik pendukung alginat dengan metode penjebakan sehingga terbentuk *beads* urea alginat. *Beads* urease alginat direaksikan dengan urea menghasilkan ion amonium. Selama ini pengukuran kadar amonium dengan metode spektrofotometri dapat menggunakan reagen Nessler. Reagen Nessler mahal dan berbahaya untuk kesehatan sehingga diperlukan pengembangan metode lain untuk menentukan kadar urea. Salah satu metode alternatif untuk mengukur kadar amonium adalah dengan menggunakan indikator pH yang murah dan ramah lingkungan yang dapat menghasilkan perubahan warna seperti bromtimol biru (BTB). BTB adalah indikator asam-basa yang banyak digunakan. Larutan BTB menunjukkan warna kuning dalam larutan asam lemah, dan berubah menjadi biru melalui hijau pada peningkatan pH (Shimada & Hasegawa, 2017). Dalam biosensor urea, urea dihidrolisis oleh urease untuk diproduksi amonia dan karbon dioksida. Reaksi ini menyebabkan peningkatan pH dan menggeser keseimbangan BTB ke bentuk yang lebih basa. yang sangat menyerap cahaya pada 620 nm (Xie & Suleiman, 1990). Hasil reaksi enzimatik dengan penambahan indikator warna BTB dapat dilakukan pengukuran menggunakan instrumen spektrofotometer untuk memperoleh nilai absorbansi. Performansi analitik biosensor urea ditentukan melalui penentuan waktu reaksi enzimatik, linearitas dan batas deteksi dan batas kuantifikasi, keberulangan analisis, keberulangan pembuatan dan pengujian senyawa pengganggu.

2. METODOLOGI PERCOBAAN

Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian adalah alat-alat yang umum digunakan di laboratorium Biokimia ditambah alat penunjang seperti neraca analitik (*Ohaus*), pH meter (*Hanna Instrument*), lemari pendingin (*LG*), inkubator, *sentrifuge* (*Quantum*), kuvet dan spektrofotometer UV-Vis (*Shimadzu UV-1800*). Bahan yang digunakan dalam penelitian adalah Kacang Tolo (*Vigna unguiculata ssp unguiculata*

L.) bibit yang dibeli dari Pasar Wage Purwokerto, alginat, akuades, kapas, aseton, sodium dihidrogen fosfat (NaH_2PO_4) (Merck, Jerman), disodium hidrogen fosfat (Na_2HPO_4) (Merck, Jerman), urea, ammonium hidroksida (NH_4OH) (Merck, Jerman), natrium asetat (CH_3COONa) (Merck, Jerman), asam klorida (HCl) (Merck, Jerman), tris base (Merck, Jerman), natrium hidroksida (NaOH) (Merck, Jerman), bromtimol biru, dan kalsium klorida (CaCl_2) (Merck, Jerman), Asam urat (Merck Jerman), dan Asam askorbat (Merck Jerman).

Cara Kerja

Preparasi sampel kacang tolo (Zusfahair, Ningsih, Fatoni, & Putri, 2018)

Kacang tolo ditimbang sebanyak 10 gram kemudian direndam dalam air selama 6 jam. Kacang tolo yang telah direndam kemudian digermisasi dalam gelap selama 8 hari dan diamati pertumbuhannya.

Isolasi enzim urease kacang (Banerjee & Aggarwal, 2012)

Sebanyak 10 gram kecambah kacang tolo dihaluskan menggunakan mortar dan pestle dalam keadaan dingin yaitu dengan mortar dan pestle yang telah disimpan dalam *freezer*. Kecambah yang telah dihaluskan lalu disuspensikan dalam 40 mL aseton 20% (v/v) dingin dan di-*stirring* dingin selama 3 jam. Suspensi setelah di-*stirring*, kemudian disaring menggunakan kain muslin, filtrat yang diperoleh disentrifus pada suhu 4 °C selama 15 menit dengan kecepatan 7000 rpm. Supernatan yang diperoleh merupakan ekstrak kasar enzim urease kacang tolo yang digunakan untuk membuat enzim amobil.

Amobilisasi urease dengan alginat

Amobilisasi enzim urease dari kacang tolo dilakukan dengan metode penjebakan menggunakan bahan pendukung alginat. Larutan alginat 5% (b/v) untuk satu sampel dibuat dengan melarutkan 0,05 g alginat menggunakan pelarut bufer fosfat 0,002 M sebanyak 0,25 mL. Larutan alginat kemudian diaduk hingga larut dan selanjutnya larutan ditambah dengan enzim urease sebanyak 0,75 mL. Selama penambahan enzim pada larutan alginat dilakukan pengadukan secara perlahan. Pembuatan matriks alginat berbentuk *beads* dilakukan dengan cara memasukkan tetesan larutan alginat ke dalam larutan CaCl_2 0,2 M menggunakan mikropipet. Waktu interaksi yang digunakan untuk *crosslinker* dilakukan dengan cara merendam *beads* alginat dalam larutan CaCl_2 selama 30 menit. *Beads* setelah direndam dengan CaCl_2 dibilas dengan akuades sehingga *beads* urease alginat siap untuk digunakan.

Pengujian urea

Pengujian biosensor dilakukan dengan menganalisis larutan urea pada suatu seri konsentrasi 1, 2, 3, 4, dan 5 mM dibuat dengan menggunakan pelarut akuades. Larutan standar urea sebanyak 2 mL ditambahkan *beads* urease alginat sebanyak 1 mL dan dibiarkan terjadi reaksi enzimatik selama 30 menit. Larutan hasil ditambah larutan indikator BTB 0,04% sebanyak 112,5 μL setelah reaksi enzimatik selesai. Pengujian ini digunakan *beads* urease alginat yang direndam dalam akuades sebagai blanko. Langkah selanjutnya absorbansi larutan diukur menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimum. Selisih absorbansi sampel dengan kontrol sebagai sumbu y dengan konsentrasi larutan uji sebagai sumbu x diplotkan menjadi kurva kalibrasi.

Penentuan waktu reaksi enzimatik

Sampel urea yang digunakan adalah urea 4 mM. Reaksi enzimatik antara urea dengan *beads* urease alginat dioptimasi pada interval waktu 5 menit selama 35 menit dengan volume sampel urea yang diujikan sebanyak 2 mL dengan penambahan *beads* urease alginat sebanyak 1 mL. Larutan hasil diuji sama dengan prosedur pada pengujian urea.

Penentuan linearitas dan penentuan batas deteksi dan batas kuantifikasi

Penentuan linearitas dan penentuan batas deteksi dan batas kuantifikasi dilakukan dengan menganalisis larutan urea konsentrasi 0,05, 1, 3, 7, dan 15 mM menggunakan beads urease alginat. Sampel urea yang diujikan sebanyak 2 mL dengan penambahan beads urease alginat sebanyak 1 mL. Larutan hasil diuji sama dengan prosedur pada pengujian urea.

Respon linear yang ditunjukkan melalui persamaan garis adalah sebagai berikut:

$$y = bx + a$$

dimana b adalah slope atau kemiringan dari kurva kalibrasi, dan a adalah intersep atau perpotongan terhadap sumbu y. Hubungan linear dinyatakan dengan koefisien korelasi (r) pada kurva kalibrasi, dimana r dapat mempunyai nilai dalam rentang $-1 \leq r \leq 1$.

Batas deteksi adalah jumlah terkecil analit dalam sampel yang dapat dideteksi yang masih memberikan respon signifikan dibandingkan dengan blanko. Batas deteksi merupakan parameter uji batas. Batas kuantifikasi merupakan parameter pada analisis renik dan diartikan sebagai kuantifikasi terkecil analit dalam sampel yang masih dapat memenuhi kriteria cermat dan seksama (Harmita, 2004).

$$Sy/x = \sqrt{\frac{\sum(Y - Yi)^2}{n - 2}}$$

$$LOD = \frac{3(Sy/x)}{b}$$

$$LOQ = \frac{10(Sy/x)}{b}$$

Keterangan:

Sy/x = Simpangan baku

LOD = Batas deteksi

LOQ = Batas kuantifikasi

b = Slope

Penentuan keberulangan analisis

Uji keseksamaan (presisi) dilakukan untuk menentukan keberulangan analisis terhadap larutan urea 4 mM yang direaksikan dengan beads urease alginat sesuai dengan prosedur C yang dianalisis secara terus menerus. Analisis dilanjutkan sampai respon bersisa sekitar 50%.

Penentuan keberulangan pembuatan

Uji ini dilakukan dengan menganalisis larutan urea konsentrasi 4 mM yang dibuat pada kondisi percobaan yang sama. Keberulangan ditentukan dengan menghitung \bar{x} , standar deviasi (SD), persentase standar deviasi (%RSD) atau koefisien variasi (KV). Persamaan yang digunakan sebagai berikut:

$$SD = \sqrt{\frac{\sum(x - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

$$\%RSD = \frac{SD}{\bar{x}} \times 100\%$$

$$KV = \frac{SD}{\bar{x}} \times 100\%$$

Nilai KV yang dihasilkan dibandingkan dengan nilai KV Horwitz yang diperoleh melalui persamaan berikut:

$$KV \text{ teoritik} = 2^{(1-0,5\log C)}$$

$$HORRAT = \frac{KV \text{ percobaan}}{KV \text{ teoritik}}$$

Nilai keberulangan yang dapat diterima adalah jika nilai HORRAT yang diperoleh kurang dari 2.

Pengujian senyawa pengganggu

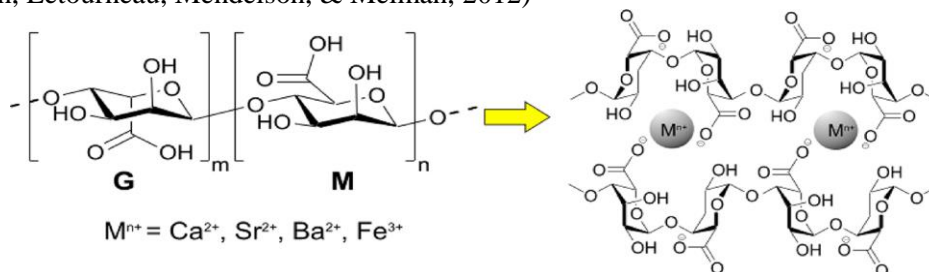
Pengujian senyawa pengganggu digunakan asam askorbat 0,05 mM dan asam urat 0,4 mM dan mencampurkannya ke dalam larutan urea 4 mM, kemudian sebanyak 2 mL larutan ditambahkan *beads* urease alginat sebanyak 1 mL dan dibiarkan terjadi reaksi enzimatik selama 10 menit. Larutan hasil diuji sama dengan prosedur pada pengujian urea.

3. HASIL DAN PEMBAHASAN

Amobilisasi Urease dengan Alginat

Amobilisasi urease kacang tolo dilakukan menggunakan matriks alginat dengan metode penjebakan. Pada amobilisasi menggunakan metode penjebakan tidak ada modifikasi biologi pada enzim sehingga aktivitas enzim ini lebih terjaga selama proses amobilisasi. Biosensor menggunakan enzim yang diamobilisasi dengan metode penjebakan sering ditandai dengan peningkatan stabilitas. Namun memiliki keterbatasan yaitu kemungkinan hambatan difusi dapat membatasi kinerja sistem (Sassolas, Blum, & Leca-bouvier, 2012).

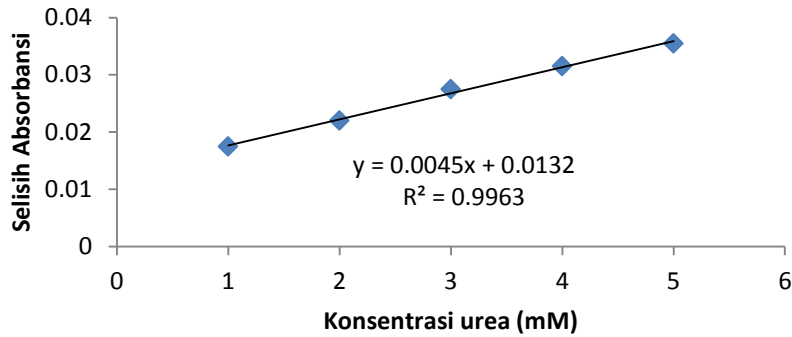
Urease kacang tolo diamobilisasi dengan metode penjebakan menggunakan matriks pendukung alginat. Pemanfaatan alginat karena mempunyai beberapa keuntungan yaitu: non toksik, relatif tidak mahal, dan mudah pengerjaannya (Nasratun, Said, Noraziah, & Alla, 2009). Alginat adalah polisakarida anionik dan hidrofilik yang terjadi secara alami. Alginat merupakan salah satu bahan biosintesis yang paling melimpah dan terutama berasal dari rumput laut coklat dan bakteri. Natrium alginat adalah garam monovalen yang banyak digunakan karena kemampuan gelifikasi yang baik dengan adanya kation divalen Ca^{+2} (Sassolas et al., 2012). Garam natrium atau kalium dari asam alginat berbentuk larutan berair homogen kental diubah menjadi hidrogel ionotropik melalui ikatan silang dengan kation logam seperti Ca^{2+} , Sr^{2+} , atau Ba^{2+} . Ikatan silang dari alginat disebabkan oleh *chelation* kation logam oleh kelompok karboksilat dari β -D-mannurate (M) dan α -L-guluronate (G) residu alginat (Gambar 1) (Narayanan, Melman, Letourneau, Mendelson, & Melman, 2012)



Gambar 1. Struktur asam alginat dan representasi skematik dari ikatan silang alginat dengan logam M^{n+} .

Pengujian Urea

Larutan urea yang digunakan pada uji adalah pada konsentrasi 1, 2, 3, 4, dan 5 mM. Blanko yang digunakan adalah *beads* urease alginat yang direndam dalam akuades. Pengukuran absorbansi dilakukan menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 616 nm. Kurva hubungan variasi konsentrasi dengan selisih absorbansi dapat dilihat pada Gambar 2.

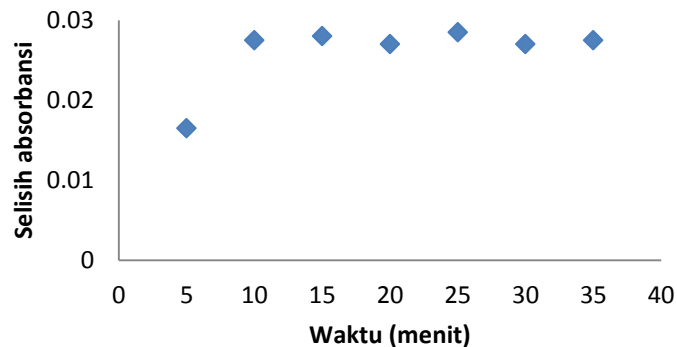


Gambar 2. Pengaruh konsentrasi urea terhadap respon pengukuran kadar urea

Pada percobaan ini urea direaksikan dengan *beads* urease alginat menghasilkan amoniak yang selanjutnya ditambahkan indikator Brom Timol Blue (BTB) dan diukur absorbansi menggunakan spektrofotometer. Data pada Gambar 2 menunjukkan bahwa konsentrasi urea berbanding lurus dengan absorbansi. Persamaan regresi yang dihasilkan yaitu $y = 0,0045x + 0,0132$, dengan kemiringan sebesar 0,0045 dan simpangan sebesar 0,0132 dengan nilai R^2 sebesar 0,9963. Respon yang linear pada pengujian urea menunjukkan bahwa produk reaksi yang dihasilkan dari reaksi urea dengan urease dari kacang tolo yang diamobilisasi dengan alginat dapat dideteksi menggunakan indikator BTB. (Xie & Suleiman, 1990) mengembangkan sensor fiber optik urea berdasarkan pada penentuan secara enzimatik amoniak yang dihasilkan dari hidrolisis urea oleh urease yang diamobilisasi dengan indikator pH BTB. Pada percobaan ini dihasilkan kurva linear pada range 0,25 mM – 8 mM dengan koefisien korelasi 0,9940.

Penentuan Waktu Reaksi Enzimatis

Pada pengujian ini larutan urea 4 mM direaksikan *beads* urease alginat diinkubasi dengan interval waktu 5 menit selama 35 menit. Blanko yang digunakan adalah *beads* urease alginat yang direndam dalam akuades. Hasil pengujian dapat dilihat pada Gambar 3.

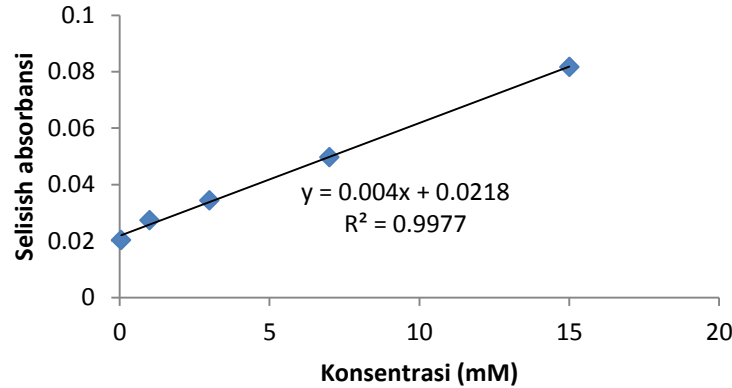


Gambar 3. Pengaruh waktu reaksi enzimatik terhadap selisih respon pengukuran

Berdasarkan data penelitian pada Gambar 3 menunjukkan respon meningkat tajam dari waktu 5 – 10 menit dan selanjutnya menunjukkan respon yang stabil sampai waktu 35. Disimpulkan urea yang direaksikan dengan urease dari kacang tolo yang diamobilisasi dengan alginat menghasilkan amoniak yang optimum pada waktu 10 menit. Waktu inkubasi 10 menit digunakan untuk penelitian selanjutnya. (Fauziyah, 2012) menyatakan biosensor urea berbasis amobilisasi urease dalam membran polianilin memperoleh sinyal yang tidak mengalami perubahan yang berarti mulai waktu 20 menit.

Penentuan linearitas

Uji linearitas dilakukan dengan menganalisis larutan urea dengan konsentrasi 0,05; 1; 3; 7; dan 15 mM menggunakan *beads* urease alginat pada kondisi optimum. Blanko yang digunakan adalah *beads* urease kacang tolo yang direndam dalam akuades. Kurva linearitas pengukuran urea hasil analisis dapat dilihat pada Gambar 4.



Gambar 4. Kurva linearitas pengukuran urea

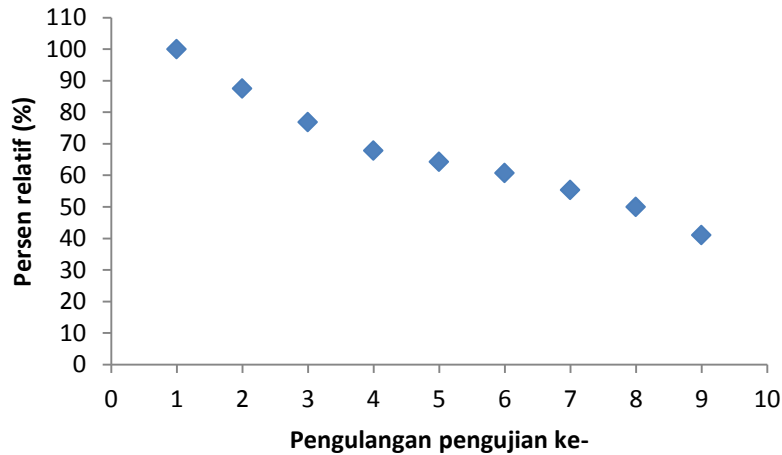
Gambar 4 memperlihatkan bahwa kurva linearitas pengukuran urea menunjukkan hubungan yang linear antara konsentrasi urea dengan selish absorbansi pada rentang konsentrasi urea 0,05 mM sampai dengan 15 mM. Persamaan regresi yang diperoleh dari kurva standar adalah $y=0,004x + 0,0218$ dengan koefisien korelasi (r) sebesar 0,9981 dan koefisien determinasi (r^2) sebesar 0,9977. Nilai koefisien korelasi (r) dan koefisien determinasi (r^2) mendekati 1 menunjukkan bahwa *beads* urease kacang tolo memberikan respon linear pada rentang konsentrasi tersebut. Biosensor urea berbasis urease rekombinan yang diamobilisasi dengan nano partikel silicalite mempunyai rentang linear dari 0,5- 15 mM (Velychko et al., 2016), sedangkan biosensor fiber optik urea berbasis pengukuran absorpsi memiliki rentang linearitas 0,25 mM – 8 mM (Xie & Suleiman, 1990).

Penentuan batas deteksi (*Limit of Detection*) (LOD) dan batas kuantifikasi (*Limit of Quantification*) (LOQ)

Berdasarkan hasil perhitungan menunjukkan bahwa nilai simpangan baku yang diperoleh sebesar 0,0010083 dengan nilai LOD yang diperoleh dari hasil pengujian sebesar 0,8 mM dan LOQ sebesar 2,67 mM. Hal ini berarti bahwa jumlah terkecil analit yang masih dapat dideteksi dalam sampel oleh *beads* urease alginat sebesar 0,8 mM. Kuantifikasi terkecil zat yang masih dapat memenuhi kriteria cermat dan seksama dalam sampel sebesar 2,67 mM.

Penentuan keberulangan analisis

Keberulangan analisis dilakukan dengan mereaksikan antara *beads* urease alginat dengan larutan urea 4mM. Blanko yang digunakan adalah *beads* urease alginat yang direndam dalam akuades. Grafik hubungan antara respon dan pengulangan dapat dilihat pada Gambar 5.

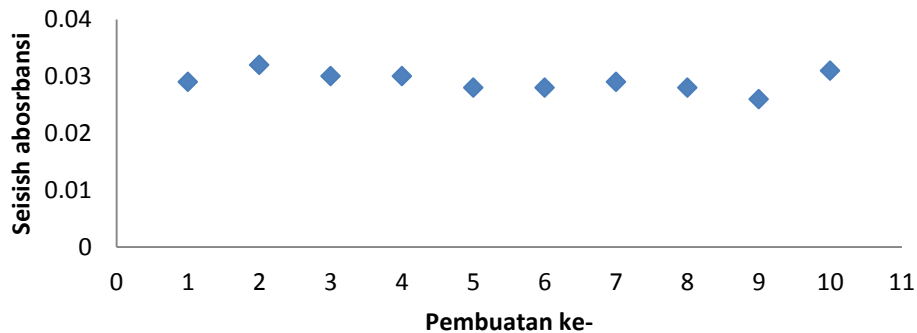


Gambar 5. Grafik hasil pengulangan analisis

Berdasarkan Gambar 5 menunjukkan respon biosensor menurun setelah digunakan berulang kali dan nilai respon relatif bersisa 50% setelah digunakan 8 kali. (Fauziyah, 2012) melakukan penelitian biosensor urea berbasis amobilisasi urease dalam membran polianilin diperoleh absorbansi pengukuran urea menurun setelah digunakan dan pada pemakaian ke 7 absorbansi yang diberikan analit sudah mendekati absorbansi blanko. Menurut (Zusfahair, Ningsih, Kartika, Fatoni, & Permatawati, 2017) permukaan beads enzim sebelum digunakan bergelombang menyebabkan luas permukaan lebih tinggi sehingga kontak enzim dengan substrat lebih banyak. Permukaan beads enzim setelah digunakan lebih rata. Hal ini menyebabkan enzim yang berada dipermukaan matrik terkikis sehingga jumlah enzim yang berkontak dengan substrat lebih sedikit. Hal ini menyebabkan respon menurun.

Penentuan Keberulangan Pembuatan

Penentuan keberulangan pembuatan *beads* urease alginat dilakukan dengan membuat 10 buah *beads* urease alginat dalam keadaan yang sama. Semua *beads* tersebut digunakan untuk mengukur kadar urea dengan konsentrasi 4 mM. Grafik hasil keberulangan pembuatan dapat dilihat pada Gambar 6.



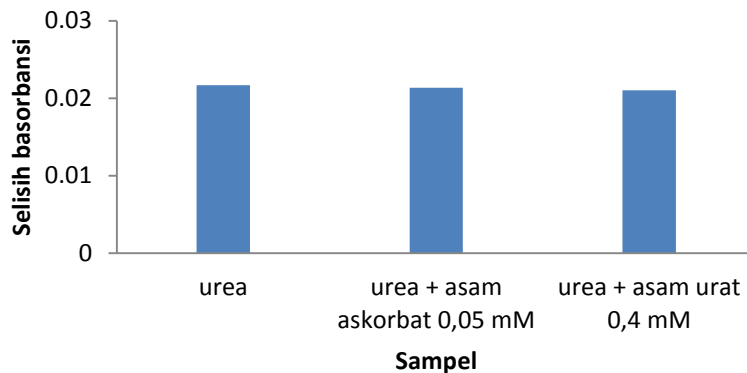
Gambar 6. Grafik keberulangan pembuatan

Hasil respon keberulangan pembuatan menunjukkan respon yang berbeda sehingga diperlukan suatu analisis lebih lanjut, yaitu dengan mencari nilai \bar{x} , SD, RSD, %RSD dan nilai HORRATnya untuk dapat mengetahui apakah data tersebut dapat diterima atau tidak. Berdasarkan hasil perhitungan *beads* urease alginat menghasilkan nilai \bar{x} sebesar 0,0291; nilai SD sebesar 0,0017; nilai RSD sebesar 0,0594; nilai %RSD sebesar 5,94% dan nilai Horratnya sebesar 0,75. Berdasarkan hubungan antara konsentrasi dengan RSD menurut referensi (Riyanto, 2014) untuk konsentrasi 4 mM memiliki nilai maksimal RSD 8.

Jadi dengan nilai RSD yang diperoleh < 8 dengan nilai Horrat < 2 dapat disimpulkan bahwa keberulangan pembuatan *beads* urease alginat masih dapat diterima.

Pengujian Senyawa Pengganggu

Pengujian senyawa pengganggu dilakukan dengan menggunakan larutan urea 4 mM ditambah asam askorbat 0,05 mM dan asam urat 0,4 mM analisis. Hasil pengujian dapat dilihat pada Gambar 7.



Gambar 7. Grafik pengujian senyawa pengganggu

Berdasarkan Gambar 7 dapat dilihat bahwa dengan penambahan asam askorbat 0,05 mM dan asam urat 0,4 mM tidak menunjukkan respon yang berbeda pada biosensor. Hasil penelitian menunjukkan hasil yang sama seperti dalam (Widihastono, 1993) yang menyatakan bahwa adanya penambahan asam askorbat 0,005 mM dan asam urat 0,2 mM dalam analisis kadar urea menggunakan enzim urease dengan elektroda tungsten tidak mempengaruhi hasil pengujian kadar urea.

4. SIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan sebagai berikut: Kadar urea dapat ditentukan dengan membuat *beads* urease alginat dengan konsentrasi alginat 5% dengan perbandingan urease biji kacang tolo dengan buffer fosfat 0,002 M (3:1) dengan CaCl_2 0,2 M. *Beads* urease alginat memiliki respon yang baik sampai 8 kali (respon $\geq 50\%$). Keberulangan pembuatan 10 kali dengan RSD 6%. Sensitivitas *beads* urease alginat ini baik karena hasil analisis kadar urea tidak terpengaruh oleh senyawa pengganggu, yaitu asam askorbat 0,05 mM dan asam urat 0,4 mM. Jangkauan dari biosensor ini linier pada konsentrasi 0,05 – 15 mM dengan nilai $y = 0,004x + 0,0218$; nilai $r^2 = 0,9977$. LOD dan LOQ yang diperoleh sebesar 0,8 mM dan 2,67 mM. Biosensor urea mempunyai kinerja analitis yang baik sehingga dapat digunakan untuk menentukan kadar urea dalam darah.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian dilaksanakan atas bantuan dana Riset Unggulan Unsoed tahun anggaran 2018.

DAFTAR PUSTAKA

- Andrich, L., Esti, M., & Moresi, M. (2010). Urea Degradation in Some White Wines by Immobilized Acid Urease in a Stirred Bioreactor. *J. Agric. Food Chem.*, 58, 6747–6753. <https://doi.org/10.1021/jf1006837>
- Banerjee, S., & Aggarwal, A. (2012). Isolation, partial purification, characterization and inhibition of urease. *Asian Journal of Bio Science*, 7(2), 203–209.

- Dindar, B., Karaku, E., & Abas, F. (2011). New Urea Biosensor Based on Urease Enzyme Obtained from *Helicobacter pylori*. *Appl Biochem Biotechnol*, *165*, 1308–1321. <https://doi.org/10.1007/s12010-011-9348-2>
- Eghbali, M., & Farahbakhsh, A. (2015). Urea Biosensor Based on Immobilization of Urease on ZnO Nanoparticles. *Or Int. J. Chem*, *31*(2), 1237–1242.
- Fauziyah, B. (2012). optimasi parameter analitik biosensor urea berbasis immobilisasi urease dalam membran polianilin. *Sainstis*, *1*(1), 65–76.
- Harmita. (2004). Petunjuk Pelaksanaan Validasi dan Cara Perhitungannya. *Majalah Ilmu Kefarmasian*, *1*(3), 117–135.
- Narayanan, R. P., Melman, G., Letourneau, N. J., Mendelson, N. L., & Melman, A. (2012). Photodegradable Iron(III) Cross-Linked Alginate Gels. *Biomacromolecules*, *13*, 2465–2471.
- Nasratun, M., Said, H. A., Noraziah, A., & Alla, A. N. A. (2009). Immobilization of Lipase from *Candida rugosa* on Chitosan Beads for Transesterification Reaction Faculty of Computer Systems and Software Engineering , Faculty of Electrical and Electronic Engineering ., *American Journal of Applied Sciences* *6*, *6*(9), 1653–1657.
- Riyanto. (2014). *Validasi & Verifikasi Metode Uji__ Sesuai dengan ISO_IEC 17025, Laboratorium*.
- Saeedfar, K., Heng, L. Y., Ling, T. L., & Rezayi, M. (2013). Potentiometric Urea Biosensor Based on an Immobilised Fullerene-Urease Bio-Conjugate. *Sensors*, *13*, 16851–16866. <https://doi.org/10.3390/s131216851>
- Sassolas, A., Blum, L. J., & Leca-bouvier, B. D. (2012). Immobilization strategies to develop enzymatic biosensors. *Biotechnology Advances*, *30*(3), 489–511. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.09.003>
- Shimada, T., & Hasegawa, T. (2017). Determination of equilibrium structures of bromothymol blue revealed by using quantum chemistry with an aid of multivariate analysis of electronic absorption spectra. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 1–31. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2017.05.040>
- Velychko, T. P., Soldatkin, O. O., Melnyk, V. G., Marchenko, S. V, Kirdeciler, S. K., Akata, B., & Soldatkin, A. P. (2016). A Novel Conductometric Urea Biosensor with Improved Analytical Characteristic Based on Recombinant Urease Adsorbed on Nanoparticle of Silicalite. *Nanoscale Research Letters*, 3–8. <https://doi.org/10.1186/s11671-016-1310-3>
- Verma, N., Kumar, R., & Sachin, M. (2012). Simple , qualitative cum quantitative , user friendly biosensor for analysis of Urea. *Advances in Applied Science Research*, *3*(1), 135–141.
- Widihastono, B. (1993). Biosensor untuk Analisis Urea Berdasarkan pada Aplikasi Enzim Urease dan Elektroda Tungsten. *JKTI*, *3*(1), 26–32.
- Xie, X., & Suleiman, A. A. (1990). A Urea Fiber Optic Biosensor Based on Absorption Measurement. *Analytical Letters*, *23*(12), 2143–2153. <https://doi.org/10.1080/00032719008052556>
- Yi, Z., Wang, H., Chen, K., Gao, Q., Tang, H., Yu, R., & Chu, X. (2014). Biosensors and Bioelectronics A novel electrochemical biosensor for sensitive detection of telomerase activity based on structure-switching DNA. *Biosensors and Bioelectronics Journal*, *53*, 310–315. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2013.09.072>

Zusfahair, Ningsih, D. R., Fatoni, A., & Putri, D. (2018). Partial purification and characterization of urease from black-eyed pea (*Vigna unguiculata ssp unguiculata* L .). *MJFAS*, *14*(1), 20–24.

Zusfahair, Ningsih, D. R., Kartika, D., Fatoni, A., & Permatawati, I. (2017). Amobilisasi dan Karakterisasi Amilase dari Bakteri *Bacillus thuringiensis* HCB6 dalam Matriks Kalsium Alginat Immobilization. *Molekul*, *12*(1), 71–79. <https://doi.org/10.20884/1.jm.2016.11.2.242>