

# PEMANFAATAN KITIN SEBAGAI BAHAN MEMBRAN ELEKTRODA ENZIM DIAMIN OKSIDASE UNTUK BIOSENSOR HISTAMIN

Abdul Karim, Abd. Rauf Patong, Abd. Wahid Wahab, Indah Raya  
Jurusan Kimia, FMIPA, Universitas Hasanuddin  
Email: karimkimia@yahoo.com

**Abstract:** *This research aims to utilize isolated chitin from shrimp waste to develop histamine biosensors based on diamine oxidase (DAO) enzyme electrode with cyclic voltammetry. DAO enzyme trapped in the chitin-cellulose acetate membranes with various comparisons were layered on the Pt electrode. Histamine will be oxidized by the DAO enzyme produces aldehydes and  $H_2O_2$  which acts as an electron transfer mediator. Biosensor performance is influenced by several factors, especially the concentration and composition of electrode membrane. Comparison of chitin-cellulose acetate used in this study were 1:1, 2:1 and 3:1. Isolated chitin from the shrimp waste is chemically obtained with a yield of 23.6%, and characterization of electrode membrane by FTIR and cyclic voltammetry showed that the DAO enzyme electrode with chitin-cellulose acetate membrane 2:1 is the best composition.*

**Keywords:** *acetate, chitin-cellulose, cyclic voltammetry, diamine oxidase, FTIR, histamine biosensors*

## 1. PENDAHULUAN

Penelitian telah banyak dilakukan guna menemukan metode terbaik untuk mendeteksi dan menentukan konsentrasi histamin dalam makanan. Histamin adalah senyawa amina biogenik hasil oksidasi dari asam amino histidin yang pada konsentrasi tertentu dapat menimbulkan alergi atau keracunan. Saat ini analisis histamin dapat dilakukan dengan berbagai cara dan metode. Menurut Standar Nasional Indonesia analisis histamin dilakukan dengan metode spektrofotometri dan KCKT (BSN, 2009). Kedua metode ini membutuhkan tenaga khusus yang terlatih dan terampil karena metodenya memerlukan preparasi awal sampel yang cukup rumit dengan waktu yang lama, disamping itu juga peralatannya relatif mahal. Untuk mengurangi waktu yang diperlukan pada analisis dan untuk menawarkan metode skrining cepat pada pengujian kualitas produk industri makanan, beberapa metode enzimatik dan sejumlah sensor enzim telah diuraikan oleh beberapa peneliti (Wimmerova *et al.*, 1999). Aplikasi biosensor secara umum menunjukkan

berbagai keuntungan seperti memungkinkan analisis yang lebih cepat dengan preparasi/pengolahan sampel yang kurang bahkan tidak diperlukan sama sekali (Lange dan Wittmann, 2001).

Beberapa penelitian untuk analisis kandungan histamin (amina biogenik) telah dilakukan antara lain; Niculescu, at al. (2001), dimana enzim DAO diamobilisasi pada membran poli vinil imidazol (PVI); Othman, at al. (2006), enzim DAO diamobilisasi pada membran poli-hidroksi etilmetakrilat (poli-HEMA), dan deteksi histamin didasarkan pada oksigen yang digunakan; Aziz (2007) menggunakan biosensor yang dikonstruksi dari enzim DAO dan diamobilisasi pada membran PVA. Fang (2011) melaporkan perkembangan sejarah, prinsip deteksi dan aplikasi biosensor, dan khusus biosensor histamin dinyatakan bahwa deteksi lebih diarahkan pada pengukuran  $H_2O_2$  yang terbentuk. Keow, at al. (2012), enzim DAO diamobilisasi pada membran poli-HEMA untuk mendeteksi histamin secara cepat menggunakan elektroda SPE-pasta karbon. Penelitian Telsnig, at al. (2012) menggunakan enzim DAO dari pea seeds amine oxidase (PSAO), dengan elektroda  $MnO_2$  yang dimodifikasi dengan pasta karbon.

Analisis dengan biosensor diharapkan dapat menggantikan instrumen kimia dengan metode klasik dan juga alternatif lain karena instrumen kimia modern pengadaannya relatif lebih mahal. Suatu kelebihan analisis biosensor karena mudah dibawa ke lapangan, relatif biaya pengadaannya murah dan cukup sensitif untuk mengidentifikasi zat atau senyawa kimia tertentu. Analisis biosensor dapat dilakukan dengan berbagai metode seperti penggunaan transduser elektrokimia (amperometri, potensiometri), termal dan sebagainya. Desain transduser dengan metode amperometri atau potensiometri dapat dilakukan dengan pengembangan elektroda enzim.

Elektroda enzim yang efektif, sensitif, dan akurat sangat ditentukan oleh komposisi membran. Penelitian yang telah dilakukan peneliti terdahulu umumnya menggunakan membran sintetik. Elektroda enzim yang akan dikembangkan dalam penelitian ini adalah elektroda enzim DAO dengan menggunakan membran kitin dan selulosa asetat dalam berbagai perbandingan untuk analisis histamin yang terdapat pada bahan tertentu, misalnya dalam ikan tuna dan cakalang. Kadar histamin dalam ikan dan makanan turunannya sangat menentukan derajat kesegaran dan keamanan bahan makanan. Kadar normal histamin dalam ikan tuna dan cakalang segar tidak lebih dari 200 ppm (Noltkamper, 2002)

Pada penelitian ini, biosensor enzim berbasis amperometri histamin akan dikembangkan, yaitu biosensor untuk mendeteksi dan menentukan kandungan histamin pada bahan tertentu. Prinsip-prinsip dasar yang digunakan

sama dengan biosensor lainnya, kecuali pada biosensor ini diperlukan DAO yang diamobilisasi pada lapisan membran menggunakan metode voltametri siklik. Oleh karena membran elektroda merupakan tempat timbulnya potensial atau arus yang dihasilkan dari reaksi yang dikatalisis oleh enzim pada membran elektroda dengan larutan yang dianalisis maka parameter membran elektroda sangat menentukan kinerja biosensor. Penggunaan biosensor histamin dengan elektroda enzim DAO yang diamobilisasikan pada membran kitin-selulosa asetat dan glutaraldehid dapat dilakukan.

Kitin dapat diisolasi dan diperoleh dengan mudah dari limbah kulit/kepala udang di kawasan industri Makassar. Pemanfaatan limbah kulit/kepala udang ini selain memberikan nilai tambah secara ekonomi sekaligus juga membantu mengurangi atau menghilangkan dampak negatif limbah pengolahan udang tersebut. Kitin memiliki kestabilan yang baik terhadap berbagai macam zat kimia, dan selulosa asetat mempunyai kekuatan mekanik yang baik dan tahan terhadap tekanan tinggi sehingga campurannya diharapkan dapat berperan sebagai membran yang baik. Penggunaan glutaraldehid juga dilakukan karena sifatnya sebagai ikatan pembawa yang berfungsi sebagai pereaksi bifungsional antara enzim dan kitin.

## **2. METODE PENELITIAN**

### **Alat**

Voltammeter siklik-eDAQ ED410-159, pH meter/potensiometer Orion 710 A, elektroda enzim, pengaduk magnetik, spektrofotometer IR Shimadzu Prestige-21, spektrofotometer UV/Vis, oven, neraca analitik, stopwatch, solder, tip kuning, dan peralatan gelas yang biasa digunakan di laboratorium.

### **Bahan**

AgCl, KCl, kawat Pt, kawat Cu, kawat Ag, akuades, HCl, NaOH, timah, glutaraldehid (GA), aseton, histamin, histidin, diamin oksidase (DAO),  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , parafilm.

### **Prosedur Kerja**

#### ***Pembuatan Larutan Buffer Fosfat***

##### ***Penyiapan larutan $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0,2 M***

Sejumlah 2,7598 gram  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  dilarutkan dengan akuades dan dimasukkan ke dalam labu ukur 100 mL. Selanjutnya diencerkan dengan akuades hingga tanda garis (larutan A)

#### *Penyiapan larutan $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,2 M*

Sejumlah 1,7799 gram  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  dilarutkan dengan akuades dan dimasukkan ke dalam labu ukur 50 mL. Selanjutnya diencerkan dengan akuades hingga tanda garis (larutan B)

Pembuatan larutan buffer fosfat dilakukan dengan mencampurkan larutan A dan larutan B sesuai dengan perbandingan masing-masing untuk buffer pH yang diinginkan.

#### ***Isolasi Kitin dari Limbah Udang***

##### *Deproteinasi*

Limbah udang diambil cangkangnya, kemudian dicuci dengan air mengalir dan dikeringkan di bawah sinar matahari sampai kering. Selanjutnya dicuci dalam air panas dua kali, lalu direbus selama 10 menit, kemudian ditiriskan dan dikeringkan. Bahan yang sudah kering digiling sampai menjadi serbuk ukuran 60 mesh. Sebanyak 50 gram serbuk tersebut dicampur dengan larutan NaOH 4,5% dengan perbandingan berat antara NaOH dan serbuk cangkang udang adalah 6:1. Selanjutnya diaduk dengan magnetik stirrer selama 1 jam, dibiarkan sebentar, lalu dipanaskan pada suhu  $90^\circ\text{C}$  selama 1 jam. Campuran kemudian disaring, terdapat residu dan filtrat. Residu didinginkan sehingga diperoleh residu padatan. Residu padatan kemudian dicuci dengan akuades sampai pH netral dan dikeringkan pada suhu  $80^\circ\text{C}$  selama 24 jam atau dijemur sampai kering.

##### *Demineralisasi*

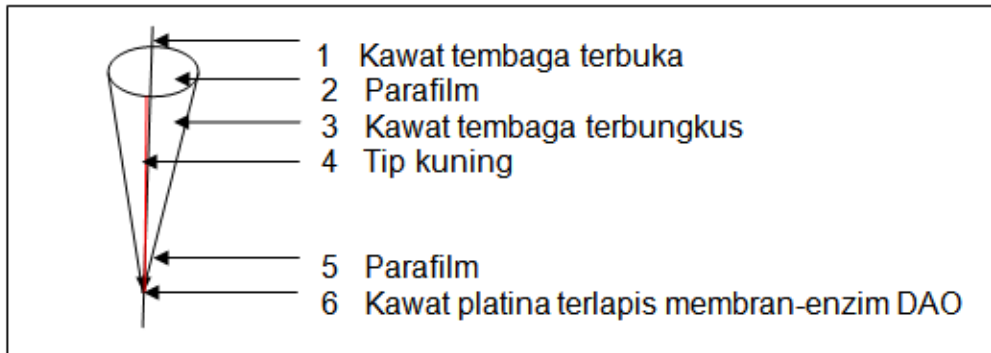
Hasil deproteinasi ditimbang kemudian dicampur dengan asam klorida 2,5 M dengan perbandingan HCl: serbuk cangkang udang hasil deproteinasi 10:1. Campuran kemudian diaduk menggunakan magnet stirer sekitar 1 jam, dibiarkan sebentar, kemudian dipanaskan pada suhu  $90^\circ\text{C}$  selama 1 jam. Residu berupa padatan dicuci dengan akuades sampai pH netral. Selanjutnya dikeringkan dalam oven pada suhu  $80^\circ\text{C}$  selama 24 jam atau dijemur sampai kering.

##### *Dekolorisasi*

Hasil yang diperoleh setelah pemisahan mineral ditimbang lalu dilarutkan dalam  $\text{H}_2\text{O}_2$  0,5% dengan perbandingan sampel : pelarut = 1:10. Sampel distirer pada suhu  $35^\circ\text{C}$  selama 30 menit. Selanjutnya disaring dengan penyaring Buchner, residunya dicuci dengan akuades hingga pH netral, kemudian dikeringkan dalam oven selama 24 jam pada suhu  $80^\circ\text{C}$ . Hasil yang diperoleh adalah serbuk kitin.

### Desain Biosensor Histamin

Kawat tembaga terlapis dengan plastik ukuran 5 cm diameter 1 mm disambungkan kawat Pt ukuran 1,5 cm diameter 0,4 mm dengan cara dipatri menggunakan kawat timah. Selanjutnya dimasukkan ke dalam tip kuning dengan komposisi kawat Pt menonjol keluar 1 cm dari ujung runcing dan untuk merekatkan digunakan parafilm (elektroda Ep). Elektroda Ep dibuat 10 buah. Bagian kawat Pt elektroda Ep dicelupkan dalam larutan homogen kitin-selulosa (1:1, 2:1, 3:1) dalam aseton. Segera setelah membran kitin-selulosa terbentuk, elektroda dicelupkan ke dalam air berulang-ulang. Selanjutnya pada bagian kawat yang telah dilapisi membran kitin-selulosa asetat direndam dalam larutan glutaraldehid (20 %) selama 6 jam. Setelah lapisan kitin-selulosa asetat yang mengandung glutaraldehid terbentuk, elektroda dicuci dengan buffer fosfat pH 7,0 (Em). Elektroda enzim DAO dibuat dengan merendam Em dalam buffer fosfat pH 7,0 yang mengandung enzim DAO selama 16 jam. Desain elektroda enzim DAO dapat dilihat pada Gambar 1 dan perbandingan konsentrasi bahan membran berbagai tipe elektroda dapat dilihat pada Tabel 1.



**Gambar 1.** Elektroda enzim DAO

**Tabel 1.** Perbandingan konsentrasi bahan membran berbagai tipe elektroda

Tipe Elektroda	Perbandingan konsentrasi bahan membran					
	Kitin (g)	(%)	SA(g)	(%)	Aseton (mL)	Kitin : SA
E <sub>1</sub>	0,10	10	0,10	10	1	1:1
E <sub>2</sub>	0,20	20	0,10	10	1	2:1
E <sub>3</sub>	0,30	30	0,10	10	1	3:1

#### *Karakterisasi membran dengan voltametri siklik*

Disiapkan larutan standar histamin:  $10^0$ ,  $10^1$ ,  $10^2$ ,  $10^3$ ,  $10^4$  ppm. Selanjutnya untuk masing-masing elektroda enzim dilakukan pemindaian potensial dari  $-1,5$  ke  $+2,0$  V dengan kecepatan  $100$  mV/detik mulai dari konsentrasi rendah ke konsentrasi yang lebih tinggi. Hasil berupa voltammogram siklik dianalisis untuk memperoleh perubahan arus puncak yang disebabkan oleh perubahan konsentrasi larutan yang digunakan.

#### *Karakterisasi membran dengan FTIR*

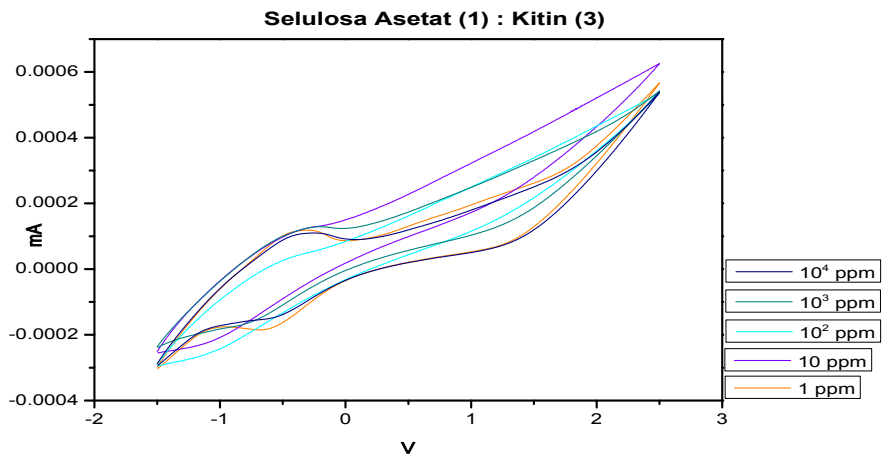
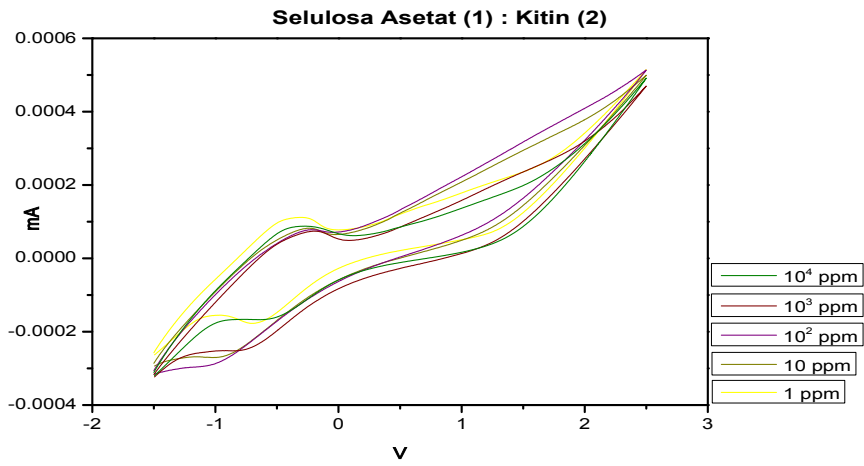
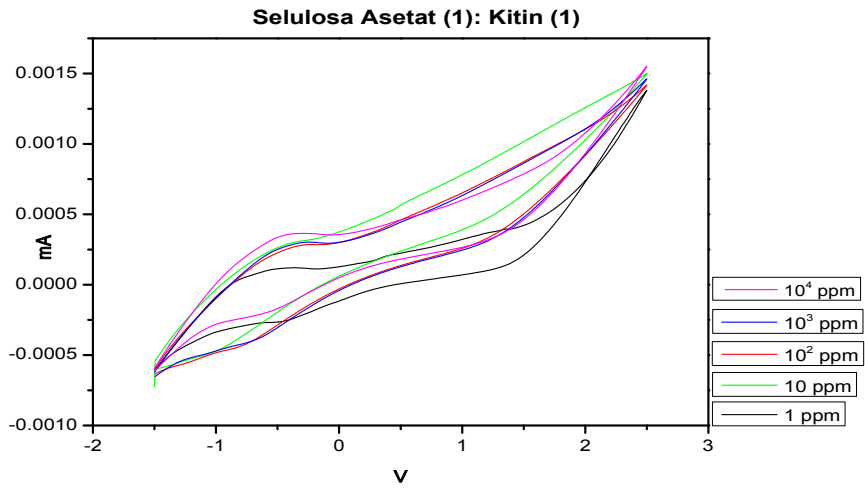
Membran elektroda kitin-selulosa asetat dengan berbagai perbandingan (1:1, 2:1, 3:1) dikarakterisasi dengan FTIR baik yang tidak maupun yang mengandung enzim DAO.

### **3. HASIL DAN PEMBAHASAN**

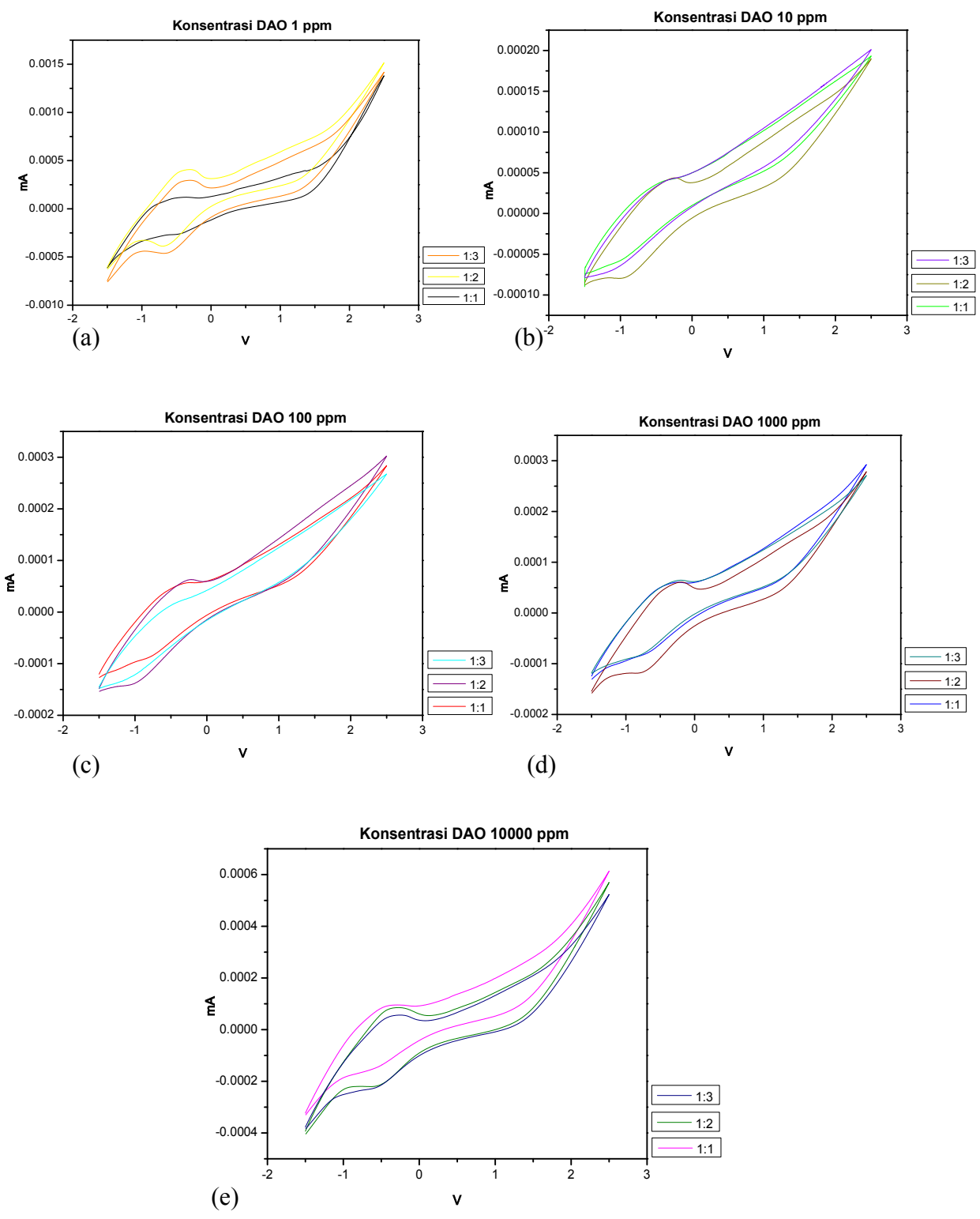
Isolasi secara kimia dari  $50$  gram sampel serbuk kulit/kepala udang  $60$  mesh yang diambil dari Kawasan Industri Makassar menghasilkan  $11,55$  gram kitin. Ini menunjukkan rendemen kitin yang cukup besar yaitu  $23,6\%$ . Besarnya kitin yang terkandung dalam limbah kulit/kepala udang mendukung pemanfaatan limbah ini dalam berbagai bidang khususnya pada pengembangan elektroda enzim DAO.

Hasil pengukuran (voltamogram) berbagai konsentrasi histamin pada berbagai perbandingan membran ditunjukkan dalam Gambar 2. Pada Gambar 2 terlihat bahwa pada perbandingan kitin-selulosa asetat 2:1(2b) menunjukkan arus puncak yang lebih jelas dan teratur dibandingkan dengan 1:1 (2a) dan 3:1 (2c). Berdasarkan hasil ini maka dapat dikatakan bahwa membran dengan perbandingan 2:1 lebih baik dibandingkan dengan perbandingan 1:1 dan 3:1.

Voltammogram berbagai perbandingan membran kitin-selulosa asetat pada berbagai konsentrasi histamin ditunjukkan pada Gambar 3. Pada Gambar 3 terlihat bahwa untuk perbandingan kitin-selulosa asetat 1:1, arus puncak hanya terjadi pada konsentrasi histamin  $10.000$  ppm (3e). Pada perbandingan kitin-selulosa asetat 2:1, arus puncak terjadi pada seluruh konsentrasi (3a,3b,3c,3d,3e). Pada perbandingan kitin-selulosa asetat 3:1, arus puncak terjadi pada konsentrasi  $1$  ppm dan  $10.000$  ppm. Hasil ini menunjukkan bahwa perbandingan kitin selulosa asetat 2:1 lebih baik daripada perbandingan lainnya dan memenuhi syarat untuk digunakan sebagai membran elektroda enzim DAO.



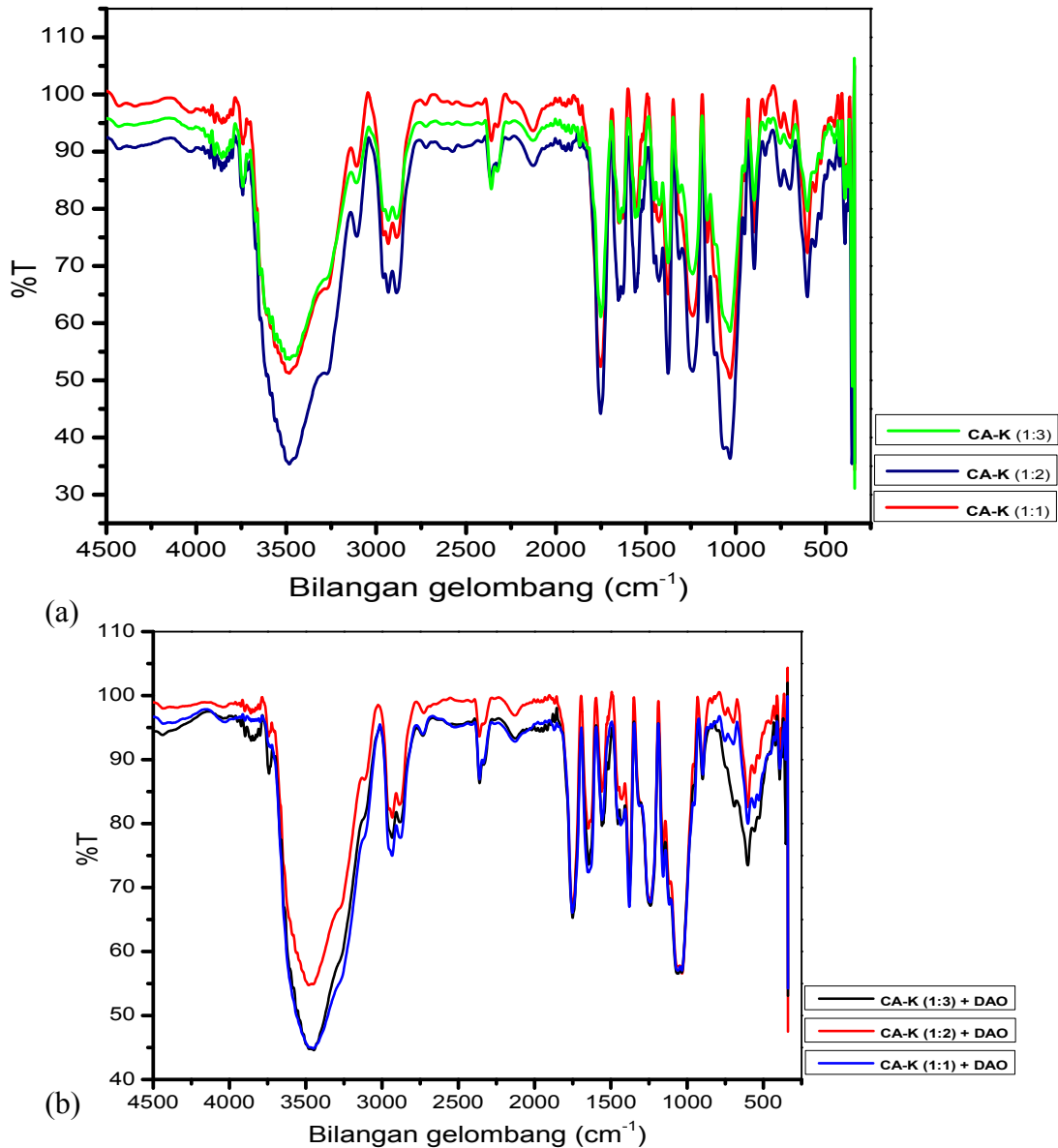
**Gambar 2.** Voltammogram siklik berbagai konsentrasi histamin



**Gambar 3.** Voltammogram siklik berbagai perbandingan membran



Spektrum FTIR membran kitin-selulosa asetat dalam berbagai perbandingan dapat dilihat pada Gambar 4. Gambar 4 memperlihatkan bahwa perbandingan membran kitin-selulosa asetat 1:1 dan 3:1, menunjukkan spektrum yang relatif sama dimana intensitas spektrum membran yang mengandung enzim DAO mengalami kenaikan.



**Gambar 4.** Spektrum FTIR membran kitin-selulosa asetat

Hal ini menunjukkan bahwa gugus fungsi antara membran dan enzim saling memperkuat. Dengan demikian enzim terikat pada membran secara fisik (bukan interaksi kimia). Sedangkan membran dengan perbandingan 2:1 yang mengandung enzim DAO, intensitasnya mengalami penurunan yang menunjukkan bahwa ada interaksi antara gugus fungsi pada membran dan enzim. Hal ini menunjukkan bahwa interaksinya merupakan interaksi kimia, dengan demikian enzim DAO terikat lebih kuat pada membran kitin-selulosa asetat 2:1.

#### **4. PENUTUP**

##### **KESIMPULAN**

- a. Hasil isolasi kitin secara kimia dari limbah kulit/kepala udang yang berasal dari Kawasan Industri Makassar diperoleh rendamen sebesar 23,6%.
- b. Perbandingan komposisi dan konsentrasi kitin-selulosa asetat yang terbaik adalah 2:1 yaitu 20% kitin dan 10% selulosa asetat.

##### **DAFTAR PUSTAKA**

- Aziz, A. A., 2007, *Developmen of A Biosensor Based On Amine Oxidase From Cicer arietinum For The Detection Of Biogenic Amines*, Faculty of Chemical and Natural Resources Engineering, University Teknologi Malaysia
- BSN, 2009, *Cara Uji Kimia – Bagian 10: Penentuan Kadar Histamin dengan Spektrofluorometri dan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) pada Produk Perikanan*, SNI 2354.10:2009
- Fang, Y., 2011, Label-Free Biosensor for Cell Biology, *Int.Journal of Electrochemistry*, Review Article Volume 2011 Article ID 460850
- Keow, C.M., Bakar, F.A., Salleh, A.B., Heng, L.Y., and Wagiran R., 2012, Screen-Printed Histamine Biosensor Fabricated from the Entrapment of Diamine Oxidase in a Photocured Poly(HEMA) Film, *Int. J. Electrochem. Sci.*, 7: 4702-4715
- Lange, J. and Wittmann, C., 2001, *Enzyme Sensor Array for the Determination of Biogenic Amines in Food Samples*. Analytical and Bioanalytical Chemistry.
- Niculescu, M., Nistor, C., Ruzgas, T., Frebort, I., Sebela, M., Pec, P. and Csoregi, E., 2001, Detection of Histamin and Other Biogenic Amines Using Biosensors Based on Amine Oxidase. *Inflamm.res.* 50: 146-148.

- Othman, N., Bakar, F.A., Salleh, A.B., Heng, L.Y., and Wagiran R., 2006, A Preliminary Investigation on Histamine Biosensor Constructed from Diamine Oxidase Immobilised onto an Oxygen Probe, *Malaysia Journal of Analytical Science*, 10: 137-142
- Telsnig, D., Terzic, A., Krenn, T., Kassarnig, V., Kalcher, K., and Ortner A., 2012, Development of a Voltammetric Amine Oxidase-Modified Biosensor for the Determination of Biogenic Amines in Food, *Int. J. Electrochem. Sci.*, 7: 6893-6903
- Wimmerova. M. and Macholan, L., 1999, Sensitif Amperometric Biosensor for the Determination of Biogenic and Synthetic Amines Using Pea Seedlings Amine Oxidase: A Novel Approach for Enzyme Immobilization. *Biosensor and Bioelectronics*. 14: 695-702