



Sintesis Kitosan dari Kulit Udang sebagai Bahan Membran Elektrode Au/Kitosan/GTA/AChE untuk Deteksi Pestisida

(*Synthesis of Chitosan from Shrimp Shell as Electrode Membrane Material Au/Chitosan/GTA/AChE for Pesticide Detection*)

Mashuni Mashuni^{a*}, Halimahtussaddiyah Ritonga^a, Muhammad Jahiding^b, Fitri Handayani Hamid^a

^aJurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Halu Oleo

^bJurusan Fisika, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Halu Oleo
Jalan H.E.A. Mokodompit, Kendari, 93232, Indonesia

*Corresponding author: mashuni2696@gmail.com

DOI: 10.20961/alchemy.18.1.56551.112-121

Received 16 November 2021, Accepted 17 January 2022, Published 01 March 2022

Kata kunci:

asetilkolinesterase;
elektrode;
kitosan;
membran;
pestisida.

ABSTRAK. Sintesis kitosan telah dikembangkan dengan metode pemanasan *microwave* (MW) menggunakan pelarut alkali untuk kebutuhan berbagai aplikasi yang salah satunya sebagai membran immobilisasi enzim. Penelitian membran kitosan dengan immobilisasi enzim asetilkolinesterase (AChE) sebagai elektrode biosensor terus berkembang untuk menghasilkan perangkat mutakhir yang dapat mendeteksi pestisida. Penelitian ini bertujuan untuk menghasilkan biosensor berbasis elektrode membran Au/Kitosan/GTA/AChE untuk deteksi pestisida karbaril yang memiliki batas deteksi yang rendah, sensitivitas yang tinggi, waktu respon cepat dan presisi yang baik. Kitosan dihasilkan dari isolasi kitin dari kulit udang menggunakan alat MW dan pelarut NaOH dengan daya 450 Watt selama 15 menit menghasilkan rendemen sebesar 31,50%. Karakterisasi FTIR kitosan diidentifikasi adanya gugus O–H, C–N, N–H amina, dan C=O dengan intensitas yang rendah serta derajat deasetilasi rata-rata $95,6 \pm 0,1\%$. Komposisi elektrode membran Au/Kitosan/GTA/AChE menggunakan kitosan dengan variasi konsentrasi 2, 5, dan 8% (b/v) dan glutaraldehid (GTA) 25%, kawat Au dan diimmobilisasikan enzim asetilkolinesterase (AChE). Elektrode membran Au/Kitosan 2%/GTA/AChE memiliki karakteristik yang baik dimana nilai sensitivitas sebesar $23,318 \text{ mV.dekade}^{-1}$ pada rentang konsentrasi pestisida $10^{-7} - 10^{-1} \mu\text{g mL}^{-1}$ dengan batas deteksi (LoD) $1 \times 10^{-7} \mu\text{g mL}^{-1}$. Waktu respon yang diperoleh yaitu pada rentang waktu 5 – 7 menit dengan *relative standard deviation* (RSD) sebesar 0,588%. Biosensor yang dikembangkan menunjukkan sensitivitas, stabilitas dan reproduktifitas yang baik, sehingga elektrode membran Au/Kitosan/GTA/AChE menjanjikan untuk alat deteksi pestisida.

Keywords:

acetylcholinesterase;
electrode;
chitosan;
membrane;
pesticide.

ABSTRACT. Chitosan synthesis has been developed using the heating by *microwave* (MW) method using alkaline solvents for various applications, one of which is an enzyme immobilization membrane. Chitosan membrane research with immobilization of the enzyme Acetylcholinesterase (AChE) as a biosensor electrode developed to produce advanced devices that can detect pesticides. This study aims to produce a biosensor based on Au/Chitosan/GTA/AChE membrane electrodes to detect carbaryl pesticides with a low detection limit, high sensitivity, fast response time, and good precision. Chitosan was produced from the isolation of chitin from shrimp shells using an MW device and NaOH solvent with a power of 450 Watts for 15 minutes to produce a yield of 31.50%. The FTIR characterization of chitosan identified the presence of O–H, C–H, C–N, N–H amine groups and C=O with low intensity and the average degree of deacetylation of $95.6 \pm 0.1\%$. The composition of Au/Chitosan/GTA/AChE membrane electrodes used chitosan with various concentrations of 2, 5, and 8% (w/v) and glutaraldehyde (GTA) 25% on Au wire and immobilized with AChE enzyme. The Au/Chitosan 2%/GTA/AChE membrane electrode has good characteristics where the sensitivity value is $23.318 \text{ mV.decade}^{-1}$ in the pesticide concentration range of $10^{-7} - 10^{-1} \mu\text{g mL}^{-1}$ with a detection limit (LoD) of $1 \times 10^{-7} \mu\text{g mL}^{-1}$. The response time obtained is in the range of 5 – 7 minutes with a relative standard deviation (RSD) of 0.588%. The developed biosensor shows good sensitivity, stability, and reproducibility, thus Au/Chitosan/GTA/AChE membrane electrodes are promising for pesticide detection.

Cite this as: Mashuni, M., Ritonga, H., Jahiding, M., & Hamid, F., 2022. Sintesis Kitosan dari Kulit Udang sebagai Bahan Membran Elektrode Au/Kitosan/GTA/AChE untuk Deteksi Pestisida. *ALCHEMY Jurnal Penelitian Kimia*, 18(1), 112-121. <http://dx.doi.org/10.20961/alchemy.18.1.56551.112-121>.

PENDAHULUAN

Kitosan [poli-(1-4)-2-amino-2-deoksi-D-glukosa] merupakan salah satu biopolimer yang paling melimpah di alam dan produk deasetilasi kitin yang diperoleh dari cangkang artropoda dan krustasea, seperti sotong, udang, lobster dan kepiting. Kitosan telah digunakan sebagai pendukung imobilisasi enzim karena sifat-sifatnya yang sangat baik seperti biokompatibilitas, ketersediaan mudah, sifat antibakteri, biodegradabilitas, tidak beracun, kelembaman fisiologis, hemostatik, fungistatik, antikarsinogenik, sifat antikolesteremia, kekuatan mekanik yang tinggi, hidrofilisitas dan peningkatan stabilitas. Demikian pula kitosan memiliki gugus fungsi reaktif (NH_3^+ dan COOH^-) yang rentan terhadap perlakuan kimia dan mampu berikatan secara kovalen dengan protein (Hu *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2014).

Sintesis kitosan terdiri dari 3 tahapan, yaitu deproteinasi, demineralisasi, dan deasetilasi. Pemilahan metode dengan meminimalkan penggunaan pelarut, meningkatkan hasil sintesis dan derajat deasetilasi adalah metode non-konvensional yang terus dikembangkan saat ini. Metode *microwave* (MW) adalah metode non-konvensional dengan menggunakan gelombang mikro sebagai sumber energi eksternal yang mempercepat terjadinya reaksi kimia (*microwave assisted reactions*) dan pelarut terbatas (Azmir *et al.*, 2013; Mashuni *et al.*, 2021). Selain itu, sintesis kitosan dengan metode MW meningkatkan derajat deasetilasi dan menurunkan berat molekul (Sahu *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2020).

Kitosan telah banyak digunakan untuk imobilisasi enzim dan pembuatan biosensor amperometrik karena biokompatibel yang sangat baik (Pavoni *et al.*, 2021; Zhai *et al.*, 2013), kemampuan pembentukan film dan mudah terhadap modifikasi kimia (Mashuni *et al.*, 2021). Kitosan banyak digunakan sebagai elektrokatalis transfer arus yang baik (Fakhrullah *et al.*, 2019), bahan pembawa untuk imobilisasi enzim dan membentuk ikat silang dengan enzim atau zat lain (Wang *et al.*, 2009). Kitosan memiliki gugus karboksil untuk ikatan silang dengan AChE dan imobilisasi kovalen enzim, yang menghasilkan stabilitas yang lebih besar dan aktivitas biomolekuler yang lebih baik. Enzim dan gugus amino pada kitosan membentuk ikatan kovalen. Selain itu, terjadi ikatan silang antara enzim dan glutaraldehid dan enzim yang terperangkap dalam manik-manik kitosan adalah salah satu teknik imobilisasi enzim utama. Pengikatan antara enzim dan permukaan dapat terjadi melalui ikatan kovalen atau ikatan silang. Glutaraldehid (GTA) yang digunakan dalam proses imobilisasi karena kemampuannya membentuk ikatan silang dengan manik-manik kitosan (Işık, 2020; Wahba, 2017).

Sejumlah pestisida termasuk beragam telah digunakan di bidang pertanian seperti golongan organofosfat (OP), karbamat (KM), triazin, *chloroacetanilides* dan piretroid untuk melindungi tanaman dari serangga dan serangan hama (Cao *et al.*, 2020; Chauhan and Pundir, 2012). Penggunaan pestisida secara luas dan dalam jangka panjang menyebabkan kontaminasi serius terhadap udara, air, tanah dan produk pertanian, yang pada akhirnya membahayakan ekosistem termasuk manusia. Karena persistensi yang relatif rendah dalam kondisi alami dan efektivitas yang tinggi untuk pemberantasan serangga dan hama, OP dan KM adalah dua kelas utama pestisida yang paling sering digunakan (Cao *et al.*, 2020; Qian and Lin, 2015). Toksisitas tinggi pestisida berasal dari kemampuannya untuk menghambat aktivitas asetilkolinesterase (AChE) secara ireversibel pada sistem saraf pusat dan tepi (perifer), mengakibatkan akumulasi *neurotransmitter* asetilkolin (ACh) dalam tubuh dengan demikian menimbulkan kerusakan serius pada sistem saraf manusia, saluran pernapasan dan sistem kardiovaskular yang dapat menyebabkan kegagalan organ dan kematian (Pundir and Chauhan, 2012). Oleh karena itu, deteksi cepat dan selektif pestisida dalam produk pertanian merupakan masalah yang mendesak untuk ditangani karena terkait dengan keselamatan manusia dan perlindungan lingkungan.

Metode baru telah dikembangkan yaitu metode elektrokimia berbasis penghambatan AChE (Cao *et al.*, 2020; Cui *et al.*, 2018). Metode elektrokimia memiliki banyak keunggulan seperti keandalan yang tinggi, instrumen sederhana, perolehan hasil yang cepat, kemudahan pengoperasian, sensitivitas tinggi dan kompatibel dengan sampel yang kompleks (Wei and Wang, 2015). Mekanisme deteksi biasanya tergantung pada reaksi katalis AChE dari asetiltiokolin (ATCl) untuk menghasilkan tiokolin elektro-aktif (TCI) (Yu *et al.*, 2015). Sehingga, pemilihan membran elektrode kerja biosensor sangat penting dalam pembuatan biosensor elektrokimia AChE. Saat ini, enzim yang digunakan dalam bidang bioteknologi meningkatkan biaya karena stabilitasnya yang rendah, sekali pakai dan sulit untuk dipulihkan. Oleh karena itu, penting untuk mengurangi biaya ini agar dapat menggunakan enzim secara lebih efektif dalam aplikasi bioteknologi.

Enzim AChE dapat diimobilisasi ke permukaan kitosan melalui GTA sebagai pengikat silang dengan metode biosensor potensiometrik (Aslam *et al.*, 2021). Akan tetapi, kitosan memiliki transfer elektron yang rendah membuatnya tidak dapat digunakan sendiri dengan begitu penggunaan elektrode emas (Au) dibutuhkan. Elektrode Au memiliki sifat fisikokimia yang unik seperti biokompatibilitas yang baik, permukaan aktif, sifat katalitik dan

konduktivitas yang sangat baik (Buiculescu and Chaniotakis, 2012). Selain itu, elektrode Au dapat meningkatkan transfer elektron antara pusat redoks dan permukaan elektrode dan bertindak sebagai katalis untuk reaksi elektrokimia (Wei and Wang, 2015).

Negm *et al.*, (2020) mengembangkan biosensor urea potensiometri sebagai transduser dengan membran elektrode kitosan/GTA sebagai bahan imobilisasi urease yang memiliki *range* konsentrasi kerja yang luas, sensitivitas yang baik dan limit deteksi yang kecil. Oleh karena itu, penelitian ini mengembangkan elektrode membran Au/kitosan/GTA terimobilisasi AChE dirancang sebagai biosensor untuk deteksi pestisida menggunakan transduser potensiometer yang diharapkan dapat diaplikasikan skala lapangan.

METODE PENELITIAN

Alat dan Bahan

Alat yang digunakan dalam penelitian ini yaitu *microwave* (SHARP R899RS-iN), *Fourier Transform Infrared Spectroscopy* (FTIR), potensiometer sebagai alat eksperimen pengukuran nilai potensial, elektrode Au sebagai elektrode kerja dan elektrode Pt sebagai katalis. Bahan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu kulit udang ukuran 250 μm , pestisida karbaril golongan senyawa karbamat (konsentrasi $10^{-7} - 10^{-1} \mu\text{g. mL}^{-1}$), enzim asetilkolinesterase (AChE, dari *electrophorus* Sigma Aldrich 1,17 mg dengan aktivitas 425,94 unit per mg (EC. 3.1.1.7)), glutaraldehid (GTA, 25% v/v dilarutkan dengan akuades), kalium klorida (KCl, $1 \times 10^{-1} \text{M}$), larutan *buffer* fosfat (BF) dengan nilai pH 8 disiapkan dengan mencampurkan larutan standar $\text{Na}_2\text{HPO}_4 2 \times 10^{-1} \text{M}$ dan $\text{NaH}_2\text{PO}_4 2 \times 10^{-1} \text{M}$. Larutan standar substrat asetiltiokolin klorida (ATCl) dengan konsentrasi $1 \times 10^{-3} \text{M}$ dalam larutan BF.

Sintesis Kitosan dari Kulit Udang

Tahapan sintesis kitosan meliputi deproteinasi, demineralisasi, dekolorisasi, dan deasetilasi merupakan modifikasi dari penelitian Zaeni *et al.* (2017) dan Mashuni *et al.* (2021). Tahap deproteinasi menggunakan larutan NaOH 4% dengan perbandingan sampel dan pelarut 1:10 (b/v) dan pemanasan pada suhu 65 °C. Kemudian sampel disaring dan dicuci dengan akuades hingga pH netral dan dikeringkan selama 6 jam suhu 80 °C. Tahap demineralisasi, menggunakan larutan HCl 1,5 M, diaduk dan dipanaskan pada suhu 75 °C selama 1 jam. Selanjutnya disaring dan residu yang dihasilkan dicuci menggunakan akuades hingga pH netral, kemudian dikeringkan pada suhu 80 °C. Tahap dekolorisasi (proses penghilangan warna), menggunakan aseton (1:15, b/v) dan dicuci dengan akuades hingga pH netral. Residu yang dihasilkan dikeringkan dalam oven dengan suhu 80 °C selama 6 jam sehingga diperoleh kitin. Tahap deasetilasi, menimbang kitin sebanyak 4 g dan menambahkan NaOH 50% (1:20, b/v). Pemanasan dengan MW pada daya 450 Watt selama 15 menit. Kitosan dicuci hingga pH netral kemudian dikeringkan pada suhu 45 °C selama 24 jam. Kitosan yang dihasilkan dilakukan uji FTIR (Mashuni *et al.*, 2021; Zaeni *et al.*, 2017).

Pembuatan Elektrode Membran Au/Kitosan/GTA/AChE

Pembuatan elektrode membran Au/kitosan/GA/AChE modifikasi pada penelitian Mashuni *et al.* (2016). Elektrode membran dibuat menggunakan badan elektrode Au dicelupkan dalam larutan kitosan dengan variasi konsentrasi 2%, 5%, dan 8% hingga terbentuk lapisan membran dan dibilas dengan akuades sebanyak tiga kali. Bagian elektrode Au yang berlapis membran kitosan direndam dalam larutan GA 25% selama 8 jam. Selanjutnya, elektrode dibilas akuades dan larutan PB pH 8 maka terbentuk elektrode membran (Em), *buffer* fosfat berfungsi untuk mempertahankan pH optimum agar enzim tetap bekerja secara optimal. Kemudian, Em direndam dalam enzim AChE selama 3×24 jam pada suhu ruang. Sebelum melakukan pengukuran respons terhadap biosensor, komponen-komponen dalam pengukuran seperti elektrode standar, elektrode kerja tipe kawat terlapis, substrat ATCl dan larutan inhibitor perlu didiamkan disuhu ruang sekitar 2 jam, agar kondisi dari komponen tersebut stabil dan dapat menghasilkan respons yang baik.

Pengukuran Nilai Potensial Elektrode Biosensor

Pengukuran potensial elektrode biosensor enzimatik dengan inhibitor pestisida karbaril konsentrasi 1×10^{-7} hingga $1 \times 10^{-1} \mu\text{g.mL}^{-1}$ dan larutan substrat asetiltiokolin klorida (ATCl) konsentrasi $1 \times 10^{-3} \text{M}$. Em digunakan untuk mengukur potensial substrat asetiltiokolin klorida dengan alat ukur potensiometer sehingga menghasilkan nilai potensial (E_0). Pengukuran dilakukan dalam interval waktu 5 – 10 menit. Waktu respon atau konstan elektrode yang diperoleh, kemudian diangkat dan dibilas dengan aquades dan *buffer* fosfat pH 8,0. Setelah itu, elektrode

direndam ke dalam larutan pestisida pada masing-masing konsentrasi selama 20 menit kemudian elektrode tersebut dibilas dalam aquades dan *buffer* fosfat pH 8,0. Kemudian, variasi konsentrasi pestisida yang diketahui ditambahkan untuk menghambat aktivitas enzim dan nilai potensial diukur (E_1), yang sebanding dengan konsentrasi inhibitor dalam larutan. Selanjutnya, penentuan persentase inhibisi (%I), nilai sensitivitas, konsentrasi kerja, limit deteksi (LoD) dan presisi (%RSD) kinerja biosensor. Persentase inhibisi (%I) dihitung berdasarkan [Persamaan \(1\)](#).

$$I\% = \frac{E_0 - E_1}{E_0} \times 100\% \quad (1)$$

Faktor Nernst (Sensitivitas)

Nilai sensitivitas ditentukan dengan menggunakan grafik hubungan antara nilai potensial dan $-\log$ konsentrasi inhibitor $1 \times 10^{-7} - 10^{-1} \mu\text{g. mL}^{-1}$. Kemudian, kita dapat melihat persamaan garis dari grafik untuk mendapatkan nilai sensitivitas elektrode pestisida karbaril, sensitivitas merupakan nilai *slope* (b) persamaan regresi $y = bx + a$ ([Bigman and Reinhardt, 2018](#)).

Limit Deteksi (LoD)

LoD adalah batas terendah konsentrasi analit yang dapat diukur oleh instrumen, yang secara statistik berbeda dari blanko. Penentuan LoD dilakukan dengan menganalisis respon potensial rangkaian larutan standar berbagai konsentrasi pestisida $1 \times 10^{-7} - 10^{-1} \mu\text{g. mL}^{-1}$. Hasil analisis diperoleh persamaan linier kurva kalibrasi, $y = ax + b$, kemudian dilakukan pengukuran nilai potensial blanko. Persamaan nilai y pada limit deteksi didasarkan pada persamaan [Christian *et al.*, \(2014\)](#). Mereka menyarankan perhitungan untuk $\text{LoD} = 3 \times (\text{SD}/S)$ berdasarkan standar deviasi (SD) dan kemiringan atau sensitivitas (S) dari kurva kalibrasi pada level yang mendekati batas.

Presisi (%RSD)

Presisi merupakan tingkat kesesuaian antara pengukuran yang berulang pada jumlah yang sama atau tingkat keterulangan dari hasil pengukuran. Presisi diukur sebagai simpangan baku atau *coefficient of variation* (% CV) dan dapat dinyatakan sebagai *reproducibility* (ketertiruan). %RSD mengacu pada "*coefficient of variation*", $\%RSD = (s/\bar{a}) \times 100\%$, di mana s adalah simpangan baku dan \bar{a} adalah rata-rata ([Mark and Workman, 2018](#)).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Karakterisasi FTIR Kitosan

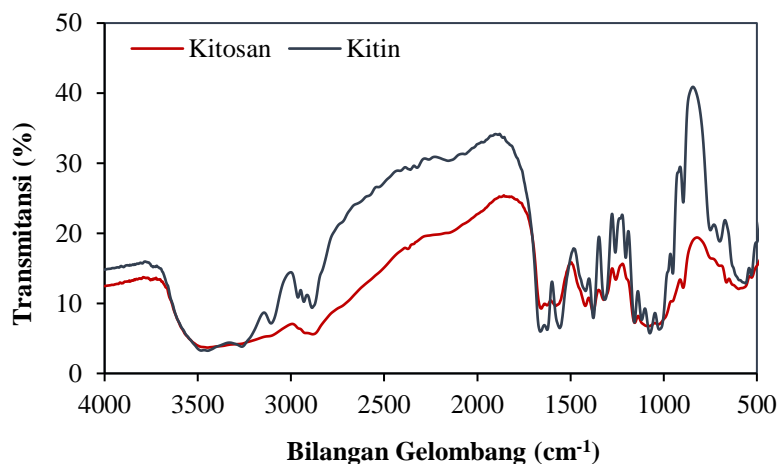
Kitin sebagai bahan untuk sintesis kitosan hasil isolasi kulit udang dengan tiga tahapan yaitu deproteinasi, demineralisasi, dan dekolorisasi dimana hasil analisis kandungan kulit udang disajikan pada [Tabel 1](#). Transformasi kitin menjadi kitosan dari limbah kulit udang menggunakan paduan pelarut alkali NaOH dan MW menghasilkan kitosan dengan persen derajat deasetilasi (DD) rata-rata $95,6 \pm 0,1\%$ dengan kadar kitosan sebesar 31,50%. Kitosan lebih baik memiliki derajat deasetilasi $>70\%$ ([Mashuni *et al.*, 2021](#)). Derajat deasetilasi yang tinggi disebabkan oleh banyaknya gugus asetil yang hilang, sehingga massa molekulnya kecil ([Baharuddin and Isnaeni, 2020](#); [Setyawati *et al.*, 2016](#)). Metode gelombang mikro akan mempercepat waktu reaksi dan meningkatkan nilai DD ([Sahu *et al.*, 2009](#)).

Tabel 1. Rendemen hasil tahapan sintesis kitosan.

Proses	Rendemen (%)	Hasil Pengamatan Visual
Protein	16,40	Orange kecoklatan
Mineral	49,60	Putih kecoklatan
Zat warna	2,50	Putih tulang
Kitosan	31,50	Putih tulang

Spektrum FTIR kitin, ditunjukkan pada [Gambar 1a](#), sebuah jendela mulai dari 1600 cm^{-1} hingga 1680 cm^{-1} , adanya amida I yang ditetapkan ke grup C=O merupakan karakteristik kitin ([Lucas *et al.*, 2021](#)). Analisis FTIR mengidentifikasi gugus fungsional kitosan terlihat puncak pada daerah serapan sekitar $3446,79 \text{ cm}^{-1}$ adanya gugus OH. Pada serapan di sekitar $2920,23 \text{ cm}^{-1}$ merupakan peregangan simetris dan asimetris C-H. Adanya gugus N-asetil pada serapan sekitar $1656,85 \text{ cm}^{-1}$ adanya peregangan C=O amida I, $1579,70 \text{ cm}^{-1}$ adanya N-H bending amida II dan $1379,10 \text{ cm}^{-1}$ adanya peregangan C-N amida III. Karakteristik serapan dari tiga kelompok N-asetil adalah khas dimana serapan tersebut melemah menunjukkan deasetilasi kitosan berhasil ([Lucas *et al.*, 2021](#)). Pita

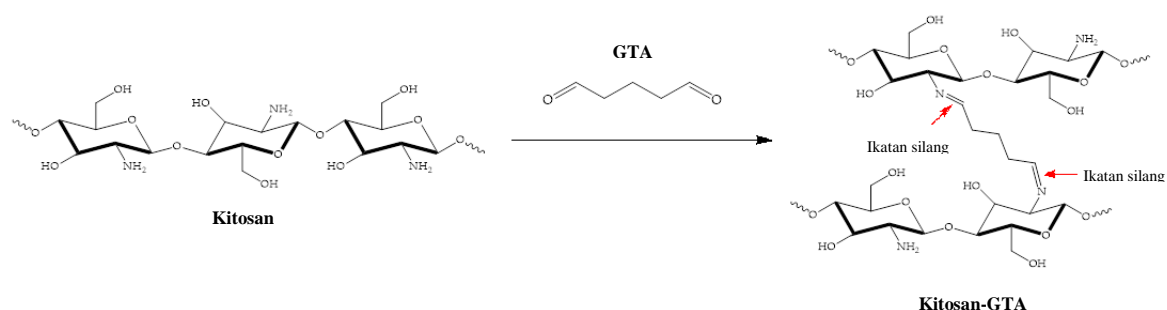
pada 1589 cm^{-1} sesuai dengan N–H *bending* dari amina primer (Lim and Hudson, 2004; Queiroz *et al.*, 2015). CH_2 *bending* dan deformasi simetris CH_3 dikonfirmasi oleh adanya pita pada masing-masing sekitar 1421 cm^{-1} dan 1379 cm^{-1} . Pita serapan pada 1155 cm^{-1} dapat dikaitkan dengan regangan asimetris jembatan C–O–C. Pita pada 1029 cm^{-1} sesuai dengan C–O *stretching* (Arulmoorthy *et al.*, 2020; Mohan *et al.*, 2020). Ikatan β -1,4-glikosidik terdapat pada daerah serapan $894,97\text{ cm}^{-1}$. Semua daerah serapan yang ditemukan dalam spektrum sampel kitosan yang dilaporkan telah sesuai dengan hasil penelitian sebelumnya (Song *et al.*, 2013; Vino *et al.*, 2012).



Gambar 1. Karakterisasi FTIR kitin dan kitosan.

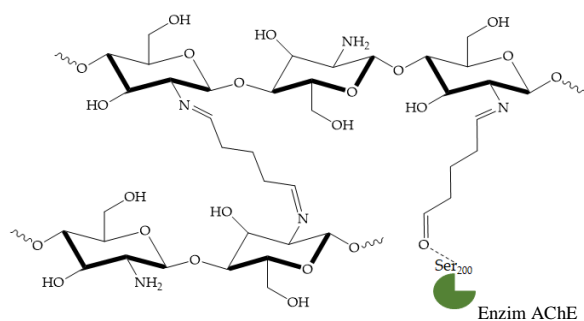
Elektrode Membran Au/Kitosan/GTA/ACHe

Interaksi antara kitosan dan glutaraldehid pada elektrode biosensor diduga adanya ikatan kovalen. Membran yang teraktivasi oleh GTA akan terbentuk ikatan kovalen antara membran kitosan dan GTA. Hal ini dikarenakan kitosan memiliki gugus amino dan hidroksil (Yeng *et al.*, 2013). Struktur GTA mempunyai 2 gugus aldehid reaktif (Gambar 2).



Gambar 2. Reaksi antara kitosan dan glutaraldehid.

Selain itu, terjadi ikatan silang antara enzim dan glutaraldehid dan enzim yang terperangkap dalam manik-manik kitosan adalah salah satu teknik imobilisasi enzim utama. Pengikatan antara enzim dan permukaan dapat terjadi melalui ikatan kovalen atau ikatan silang. Glutaraldehid (GTA) yang digunakan dalam proses imobilisasi karena kemampuannya membentuk ikatan silang dengan gugus amino kitosan dan interaksi antara gugus OH pada enzim (Işık, 2020; Wahba, 2017). Gambar 3, menunjukkan interaksi kitosan/GTA dengan enzim. Enzim AChE akan mengalami interaksi dengan GTA dan GTA membentuk ikatan kovalen dengan kitosan. Sehingga enzim terperangkap dalam membran tersebut.

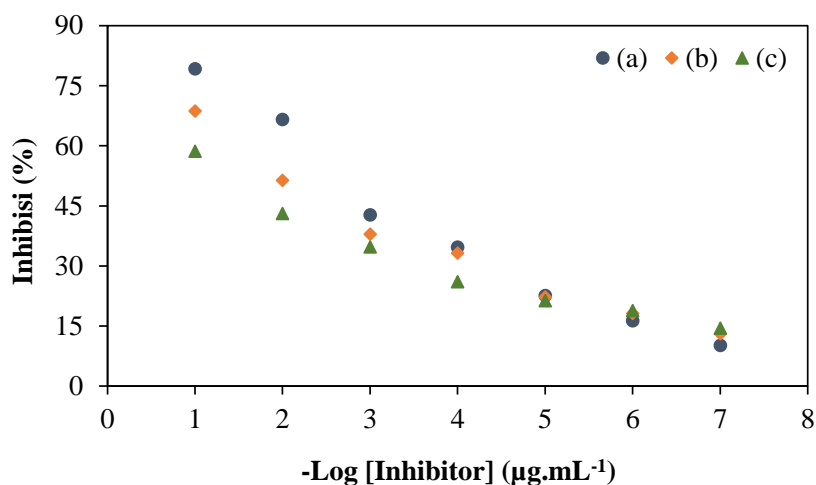


Gambar 3. Interaksi kitosan/GTA dengan enzim.

Mekanisme kinerja biosensor dengan komposisi elektrode membran Au/kitosan/GTA/AChE dalam menganalisis pestisida karbaril golongan karbamat menggunakan potensiometri telah dilakukan. Pestisida karbamat menghambat enzim secara irreversibel karena mengalami pembentukan ikatan kovalen dengan residu serin (Ser₂₀₀) yang ada di sisi aktif AChE melalui serangan nukleofilik dan menghasilkan enzim *carbamyl*, yang tidak dapat mengkatalisis asetilkolin (Pohanka *et al.*, 2009). Interaksi antara enzim asetilkolinesterase dan inhibitor akan membentuk ikatan kovalen antara sisi aktif enzim AChE dan inhibitor (Pundir *et al.*, 2019).

Persentase Inhibisi (%I)

Persentase inhibisi (%I) merupakan daya hambat pestisida terhadap kinerja enzim. Umumnya, desain biosensor pestisida mengandalkan pengukuran secara kuantitatif pada aktivitas enzim sebelum dan sesudah dikontakkan dengan substrat. %I diperoleh setelah interaksi dengan inhibitor akibatnya aktivitas residu enzim. Inhibitor yang dimaksudkan adalah pestisida karbaril. Pemberian inhibitor memberikan pengaruh aktivitas enzim dan konsentrasi produk yang dihasilkan sehingga nilai potensial yang diperoleh kecil.



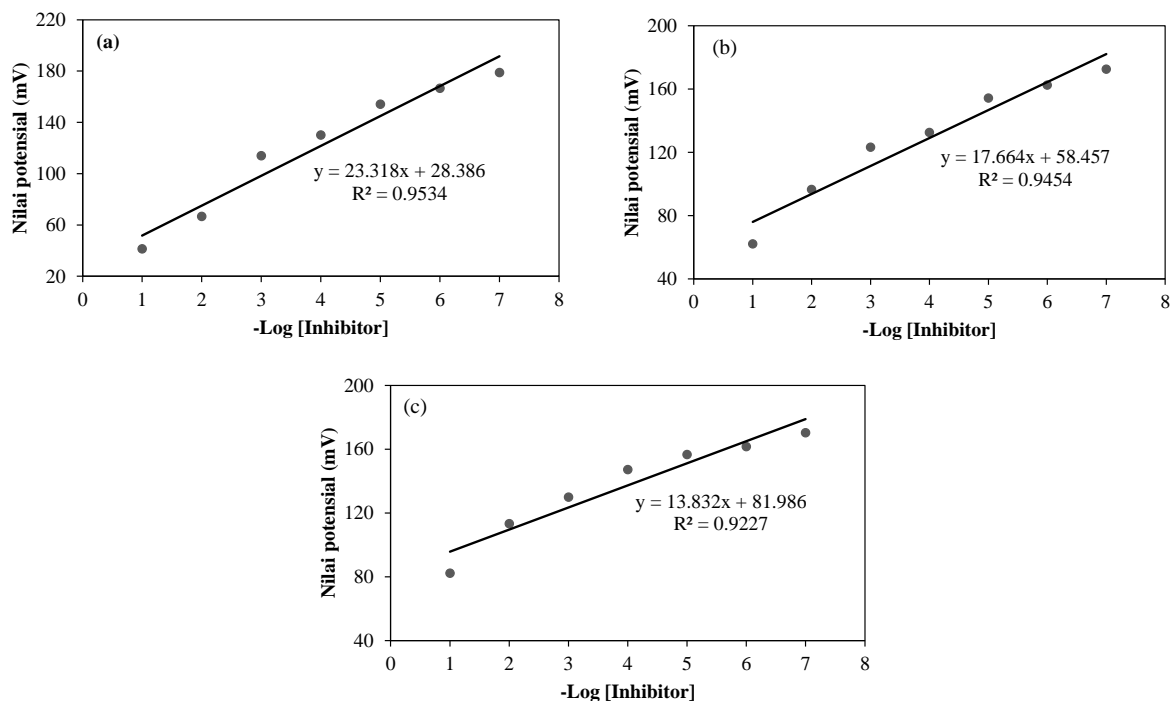
Gambar 4. Persentase inhibisi pengaruh komposisi elektrode membran (a) Au/kitosan 2%/GTA/AChE, (b) Au/kitosan 5%/GTA/AChE dan (c) Au/kitosan 8%/GTA/AChE.

Gambar 4, menunjukkan bahwa pestisida karbaril telah berhasil menghambat aktivitas enzim AChE. Penurunan nilai potensial untuk variasi komposisi membran elektrode dalam menganalisis pestisida karbaril dari 1×10^{-7} sampai 1×10^{-1} µg.mL⁻¹. Diasumsikan bahwa semakin tinggi konsentrasi inhibitor, maka semakin tinggi pula kemampuan inhibitor menghambat aktivitas enzim AChE dalam menghidrolisis substrat asetiltiokolin.

Faktor Nernst (Sensitivitas)

Sensitivitas didefinisikan sebagai perubahan konsentrasi analit dan nilai *slope* dari kurva yang diperoleh dari konsentrasi tertentu (Bigman and Reinhardt, 2018). Nilai sensitivitas yang besar memberikan perubahan konsentrasi yang kecil dari analit dan memberikan respon yang berarti. Karakteristik sensitivitas dapat ditentukan dari persamaan regresi kurva linieritas. Sensitivitas merupakan nilai *slope* (b) persamaan regresi $y = bx + a$. **Gambar 5a**, menunjukkan nilai sensitivitas elektrode membran Au/kitosan 2%/GTA/AChE dalam mendeteksi

pestisida karbaril sebesar $23,318 \text{ mV.dekade}^{-1}$ pada suhu $24 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$. Sedangkan, elektrode membran dengan konsentrasi kitosan 5 dan 8% masing-masing sebesar $17,664$ dan $13,832 \text{ mV.dekade}^{-1}$. Sensitivitas membran dengan kitosan 2% lebih baik dibanding kitosan 5% dan 8%. Hal ini disebabkan karena besarnya konsentrasi membran kitosan yang digunakan menimbulkan pengaruh nyata. Di mana, konsentrasi membran yang besar maka membran mempunyai pori yang lebih kecil, sehingga memberikan hambatan yang besar dan permeabilitas menjadi lebih kecil. Permeabilitas merupakan sifat dari kinerja membran yang menunjukkan produktivitas membran (Kamal, 2010).



Gambar 5. Grafik hubungan $-\text{Log} [\text{inhibitor}]$ dengan nilai potensial pengaruh komposisi elektrode membran (a) Au/kitosan 2%/GTA/AChE, (b) Au/kitosan 5%/GTA/AChE dan (c) Au/kitosan 8%/GTA/AChE.

Konsentrasi Kerja dan Limit Deteksi (LoD)

Tabel 2, menunjukkan konsentrasi kerja berkisar pada 1×10^{-7} sampai $1 \times 10^{-1} \mu\text{g.mL}^{-1}$ dengan persamaan regresi linear (R^2) masing-masing komposisi membran yaitu 0,9534; 0,9454 dan 0,9227. Biosensor yang disiapkan menunjukkan rentang linier yang lebar dan deteksi yang lebih rendah. LoD didefinisikan sebagai konsentrasi analit terendah dalam sampel yang dapat dideteksi atau terukur secara konsisten oleh elektrode (Vashist and Luong, 2018). Tabel 2, menunjukkan LoD atau kemampuan biosensor mendeteksi pestisida karbaril yaitu pada konsentrasi $1 \times 10^{-7} \mu\text{g.mL}^{-1}$. Konsentrasi terendah dapat terukur untuk ketiga komposisi membran yang diperoleh sudah baik. Selain itu, ketiga elektrode membran masing-masing memiliki *relative standard deviation* (RSD) kurang dari 2% (<2%). Namun, elektrode membran Au/kitosan 2%/GTA/AChE memiliki RSD sebesar 0,588% menunjukkan reprodutifitas yang dapat diterima.

Tabel 2. Analisis pengukuran kinerja biosensor.

Modifikasi Membran	Konsentrasi Kerja ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Nilai Sensitivitas (mV.dekade^{-1})	Waktu Respon (menit)	RSD (%)	LoD ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)
Au/kitosan 2%/GTA/AChE		23,318		0,588	
Au/kitosan 5%/GTA/AChE	$1 \times 10^{-1} - 1 \times 10^{-7}$	17,664	5 – 7	1,052	1×10^{-7}
Au/kitosan 8%/GTA/AChE		13,832		0,863	

Waktu Respon

Waktu respon, didefinisikan sebagai waktu yang berlalu sebelum perubahan pembacaan atau merupakan waktu yang diperlukan suatu elektrode biosensor untuk mencapai nilai potensial yang stabil atau konstan (Bigman and Reinhardt, 2018). Kecepatan transfer elektron dari permukaan enzim ke permukaan elektrode untuk

memberikan respon pengukuran yang akurat. Waktu respon yang diperlukan untuk mencapai nilai potensial yang konstan sehingga menunjukkan kualitas elektrode biosensor akan semakin baik. **Tabel 2**, menunjukkan waktu respon untuk elektrode biosensor membran Au/Kitosan/GTA/AChE memperlihatkan waktu yang dibutuhkan biosensor dalam menganalisis pestisida karbaril dan diazinon pada *range* 5 – 7 menit. Diasumsikan bahwa semakin besar konsentrasi pestisida karbaril dalam analit, waktu yang diperlukan untuk menghasilkan asam asetat semakin kecil yang berarti aktivitas enzim makin menurun, maka waktu respon yang diperoleh semakin cepat.

KESIMPULAN

Membran kitosan diperoleh melalui isolasi dan deasetilasi kitin dari kulit udang dengan metode pemanasan *microwave* (MW) dan pelarut alkali NaOH. Kawat elektrode Au berlapis membran kitosan diimobilisasikan enzim AChE membentuk interaksi dan ikatan kovalen pada gugus NH₂ kitosan melalui ikatan silang dengan GTA. Kitosan dipilih sebagai membran imobilisasi enzim dan pembuatan biosensor potensiometer karena biokompatibel yang sangat baik. Selain itu, kitosan sebagai bahan imobilisasi enzim pada desain biosensor pestisida karbaril menghasilkan stabilitas kinerja biosensor terlihat dengan adanya variasi konsentrasi kitosan (2%, 5%, and 8%) pada membran elektrode semuanya memperlihatkan rentang konsentrasi kerja $1 \times 10^{-7} - 10^{-1} \mu\text{g mL}^{-1}$ dan LoD $1 \times 10^{-7} \mu\text{g mL}^{-1}$, waktu respon 5 – 7 menit dan presisi dengan persen *relative standard deviation* (RSD) < 2%. Elektrode membran Au/Kitosan 2%/GTA/AChE memiliki karakteristik yang lebih baik karena memiliki nilai sensitivitas yang paling tinggi yaitu 23,318 mV.dekade⁻¹.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada semua tim atas kontribusinya terhadap penelitian ini, Universitas Halu Oleo (UHO) dan Kementerian Pendidikan, Kebudayaan, Riset dan Teknologi Republik Indonesia telah mendanai penelitian ini dalam Penelitian Terapan untuk tahun anggaran 2021.

DAFTAR PUSTAKA

- Arulmoorthy, M.P., Anbarasi, G., Srinivasan, M., and Vishnupriya, B., 2020. Biosynthesis and Characterization of Chitosan Based Hydrogel: A Potential in Vitro Wound Healing Agent, in: *Materials Today: Proceedings*. Elsevier Ltd, p. xxx. doi: 10.1016/j.matpr.2020.07.186.
- Aslam, S., Asgher, M., Khan, N.A., and Bilal, M., 2021. Immobilization of Pleurotus nebrodensis WC 850 Laccase on Glutaraldehyde Cross-Linked Chitosan Beads for Enhanced Biocatalytic Degradation of Textile Dyes. *Journal of Water Process Engineering* 40, 101971. doi: 10.1016/j.jwpe.2021.101971.
- Azmir, J., Zaidul, I.S.M., Rahman, M.M., Sharif, K.M., Mohamed, A., Sahena, F., Jahurul, M.H.A., Ghafoor, K., Norulaini, N.A.N., and Omar, A.K.M., 2013. Techniques for Extraction of Bioactive Compounds from Plant Materials: A Review. *Journal of Food Engineering* 117, 426–436. doi: 10.1016/j.jfoodeng.2013.01.014.
- Baharuddin, S., and Isnaeni, D., 2020. Isolasi dan Uji Aktivitas Kitosan Cangkang Kerang Bulu (*Anadara inflata*) sebagai Antibakteri terhadap *Staphylococcus epidermidis* dan *Escherichia coli*. *MPI (Media Pharmacy Indonesia)* 3, 60–69. doi: 10.24123/mpi.v3i2.3181.
- Bigman, J.L., and Reinhardt, K.A., 2018. Monitoring of Chemicals and Water, Handbook of Silicon Wafer Cleaning Technology. Elsevier Inc. doi: 10.1016/B978-0-323-51084-4.00011-3.
- Buiculescu, R., and Chaniotakis, N.A., 2012. The Stabilization of Au NP-AChE Nanocomposites by Biosilica Encapsulation for the Development of a Thiocholine Biosensor. *Bioelectrochemistry* 86, 72–77. doi: 10.1016/j.bioelechem.2012.02.005.
- Cao, J., Wang, M., Yu, H., She, Y., Cao, Z., Ye, J., Abd El-Aty, A.M., Haclmüftüoğlu, A., Wang, J., and Lao, S., 2020. An Overview on the Mechanisms and Applications of Enzyme Inhibition-Based Methods for Determination of Organophosphate and Carbamate Pesticides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 68, 7298–7315. doi: 10.1021/acs.jafc.0c01962.
- Chauhan, N., and Pundir, C.S., 2012. An amperometric Acetylcholinesterase Sensor Based on Fe₃O₄ Nanoparticle/Multi-Walled Carbon Nanotube-Modified ITO-Coated Glass Plate for the Detection of Pesticides. *Electrochimica Acta* 67, 79–86. doi: 10.1016/j.electacta.2012.02.012.
- Christian, G.D., Dasgupta, P.K., and Kevin A. S., 2014. Analytical Chemistry, 7th ed. Wiley, Hoboken, NJ. doi: 10.1021/ed063pa277.3.
- Cui, H.F., Wu, W.W., Li, M.M., Song, X., Lv, Y., and Zhang, T.T., 2018. A Highly Stable Acetylcholinesterase Biosensor Based on Chitosan-TiO₂-Graphene Nanocomposites for Detection of Organophosphate Pesticides. *Biosensors and Bioelectronics* 99, 223–229. doi: 10.1016/j.bios.2017.07.068.

- Fakhrullah, F., Sugita, P., Khotib, M., Akiyoshi, T., and Takahashi, S., 2019. Komposit Polianilina/Kitosan/Perak Nanowires Sebagai Elektrokatalis Reaksi Evolusi Hidrogen dalam Medium Netral. *ALCHEMY Jurnal Penelitian Kimia* 15, 190. doi: 10.20961/alchemy.15.2.30460.190-202.
- Hu, T.G., Cheng, J.H., Zhang, B.B., Lou, W.Y., and Zong, M.H., 2015. Immobilization of Alkaline Protease on Amino-Functionalized Magnetic Nanoparticles and its Efficient Use for Preparation of Oat Polypeptides. *Industrial & Engineering Chemistry Research* 54, 4689–4698. doi: 10.1021/ie504691j.
- Işık, M., 2020. High Stability of Immobilized Acetylcholinesterase on Chitosan Beads. *ChemistrySelect* 5, 4623–4627. doi: 10.1002/slct.202000559.
- Kamal, N., 2010. Pengaruh Bahan Aditif CMC (Carboxymethyl Cellulose) terhadap Beberapa Parameter pada Larutan Sukrosa. *Jurnal Teknologi* 1, 78–85.
- Lim, S.H., and Hudson, S.M., 2004. Synthesis and Antimicrobial Activity of a Water-Soluble Chitosan Derivative with a Fiber-Reactive Group. *Carbohydrate Research* 339, 313–319. doi: 10.1016/j.carres.2003.10.024.
- Lucas, A.J. da S., Oreste, E.Q., Costa, H.L.G., López, H.M., Saad, C.D.M., and Prentice, C., 2021. Extraction, Physicochemical Characterization, and Morphological Properties of Chitin and Chitosan from Cuticles of Edible Insects. *Food Chemistry* 343, 128550. doi: 10.1016/j.foodchem.2020.128550.
- Mark, H., and Workman, J., 2018. Limitations in Analytical Accuracy: Part 1—Horwitz’s Trumpet, 2nd ed, Chemometrics in Spectroscopy. Elsevier Inc. doi: 10.1016/b978-0-12-805309-6.00072-6.
- Mashuni, M., Natsir, M., Lestari, W.M., Hamid, F.H., and Jahiding, M., 2021. Pemanfaatan Kitosan dari Cangkang Kepiting Bakau (*Scylla serrata*) dengan Metode Microwave sebagai Bahan Dasar Kapsul Obat. *ALCHEMY Jurnal Penelitian Kimia* 17, 74. doi: 10.20961/alchemy.17.1.42038.74-82.
- Mashuni, Ramadhan, L.O.A.N., Jahiding, M., and Herniati, 2016. Analysis of Diazinon Pesticide using Potentiometric Biosensor Based on Enzyme Immobilized Cellulose Acetate Membrane in Gold Electrode, in: IOP Conference Series: Materials Science and Engineering 10th Joint Conference on Chemistry, pp. 1–7. doi: 10.1088/1757-899X/107/1/012013.
- Mohan, K., Ganesan, A.R., Muralisankar, T., Jayakumar, R., Sathishkumar, P., Uthayakumar, V., Chandirasekar, R., and Revathi, N., 2020. Recent Insights into the Extraction, Characterization, and Bioactivities of Chitin and Chitosan from Insects. *Trends in Food Science and Technology* 105, 17–42. doi: 10.1016/j.tifs.2020.08.016.
- Negm, N.A., Abubshait, H.A., Abubshait, S.A., Abou Kana, M.T.H., Mohamed, E.A., and Betiha, M.M., 2020. Performance of Chitosan Polymer as Platform during Sensors Fabrication and Sensing Applications. *International Journal of Biological Macromolecules* 165, 402–435. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2020.09.130.
- Pavoni, J.M.F., dos Santos, N.Z., May, I.C., Pollo, L.D., and Tessaro, I.C., 2021. Impact of Acid Type and Glutaraldehyde Crosslinking in the Physicochemical and Mechanical Properties and Biodegradability of Chitosan Films. *Polymer Bulletin* 78, 981–1000. doi: 10.1007/s00289-020-03140-4.
- Pohanka, M., Musilek, K., and Kuca, K., 2009. Progress of Biosensors Based on Cholinesterase Inhibition. *Current Medicinal Chemistry* 16, 1790–1798. doi: 10.2174/092986709788186129.
- Pundir, C.S., and Chauhan, N., 2012. Acetylcholinesterase Inhibition-Based Biosensors for Pesticide Determination: A Review. *Analytical Biochemistry* 429, 19–31. doi: 10.1016/j.ab.2012.06.025.
- Pundir, C.S., Malik, A., and Preeti, 2019. Bio-sensing of Organophosphorus Pesticides: A Review. *Biosensors and Bioelectronics* 140. doi: 10.1016/j.bios.2019.111348.
- Qian, S., and Lin, H., 2015. Colorimetric Sensor Array for Detection and Identification of Organophosphorus and Carbamate Pesticides. *Analytical Chemistry* 87, 5395–5400. doi: 10.1021/acs.analchem.5b00738.
- Queiroz, M.F., Melo, K.R.T., Sabry, D.A., Sasaki, G.L., and Rocha, H.A.O., 2015. Does the Use of Chitosan Contribute to Oxalate Kidney Stone Formation? *Marine Drugs* 13, 141–158. doi: 10.3390/md13010141.
- Sahu, A., Goswami, P., and Bora, U., 2009. Microwave Mediated Rapid Synthesis of Chitosan. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 20, 171–175. doi: 10.1007/s10856-008-3549-4.
- Setyawati, A., Pranowo, D., and Kartini, I., 2016. Effect of Microwave Irradiation on Synthesis of Chitosan for Biomedical Grade Applications of Biodegradable Materials. *Jurnal Eksakta* 16, 137–148. doi: 10.20885/eksakta.vol16.iss2.art8.
- Song, C., Yu, H., Zhang, M., Yang, Y., and Zhang, G., 2013. Physicochemical Properties and Antioxidant Activity of Chitosan from the Blowfly *Chrysomya megacephala* Larvae. *International Journal of Biological Macromolecules* 60, 347–354. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2013.05.039.
- Vashist, S.K., and Luong, J.H.T., 2018. Bioanalytical Requirements and Regulatory Guidelines for Immunoassays, Handbook of Immunoassay Technologies: Approaches, Performances, and Applications. Elsevier Inc. doi: 10.1016/B978-0-12-811762-0.00004-9.

- Vino, A.B., Ramasamy, P., Shanmugam, V., and Shanmugam, A., 2012. Extraction, Characterization and In Vitro Antioxidative Potential of Chitosan and Sulfated Chitosan from Cuttlebone of *Sepia aculeata* Orbigny, 1848. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* 2, 334–341. doi: 10.1016/S2221-1691(12)60184-1.
- Wahba, M.I., 2017. Chitosan-glutaraldehyde Activated Calcium Pectinate Beads as a Covalent Immobilization Support. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* 12, 266–274. doi: 10.1016/j.bcab.2017.10.016.
- Wang, S. nan, Zhang, C. ran, Qi, B. kun, Sui, X. nan, Jiang, L. zhou, Li, Y., Wang, Z. jiang, Feng, H. xia, Wang, R., and Zhang, Q. zhi, 2014. Immobilized Alcalase Alkaline Protease on the Magnetic Chitosan Nanoparticles Used for Soy Protein Isolate Hydrolysis. *European Food Research and Technology* 239, 1051–1059. doi: 10.1007/s00217-014-2301-1.
- Wang, X., Gu, H., Yin, F., and Tu, Y., 2009. A Glucose Biosensor Based on Prussian Blue/Chitosan Hybrid Film. *Biosensors and Bioelectronics* 24, 1527–1530. doi: 10.1016/j.bios.2008.09.025.
- Wei, M., and Wang, J., 2015. A Novel Acetylcholinesterase Biosensor Based on Ionic Liquids-AuNPs-Porous Carbon Composite Matrix for Detection of Organophosphate Pesticides. *Sensors Actuators, B Chem.* 211, 290–296. doi: 10.1016/j.snb.2015.01.112.
- Yeng, C.M., Husseinsyah, S., and Ting, S.S., 2013. Chitosan/corn Cob Biocomposite Films by Cross-Linking with Glutaraldehyde. *BioResources* 8, 2910–2923. doi: 10.15376/biores.8.2.2910-2923.
- Yu, G., Wu, W., Zhao, Q., Wei, X., and Lu, Q., 2015. Efficient Immobilization of Acetylcholinesterase onto Amino Functionalized Carbon Nanotubes for the Fabrication of High Sensitive Organophosphorus Pesticides Biosensors. *Biosensors and Bioelectronics* 68, 288–294. doi: 10.1016/j.bios.2015.01.005.
- Zaeni, A., Fuadah, B., and Sudiana, I.N., 2017. Efek Microwave pada Proses Deasetilasi Kitin dari Limbah Cangkang Udang. *Journal of Applied Physics* 13, 48–53.
- Zhai, C., Sun, X., Zhao, W., Gong, Z., and Wang, X., 2013. Acetylcholinesterase Biosensor Based on Chitosan/Prussian Blue/Multiwall Carbon Nanotubes/Hollow Gold Nanospheres Nanocomposite Film by One-Step Electrodeposition. *Biosensors and Bioelectronics* 42, 124–130. doi: 10.1016/j.bios.2012.10.058.
- Zhang, X., Teng, Z., and Huang, R., 2020. Biodegradable Starch/Chitosan Foam via Microwave Assisted Preparation: Morphology and Performance Properties. *Polymers (Basel)*. 12, 1–17. doi: 10.3390/polym12112612.