

## ENCAPSULATION OF HORSERADISH PEROXIDASE-GLUCOSE OXIDASE (HRP-GOx) IN SILICA AQUAGEL SYNTHESIZED FROM RICE HULL ASH FOR ENZYMATIC REACTION OF GLUCOSE

*Encapsulasi Horseradish Peroxidase-Glucose Oxidase (HRP-GOx) dalam Silika Aquagel yang Disintesis dari Abu Sekam Padi untuk Reaksi Enzimatis Glukosa*

Nuryono\*, Narsito, and Endang Astuti

Department of Chemistry, Faculty of Mathematics and Natural Sciences,  
Gadjah Mada University, Sekip Utara, Yogyakarta 55281

Received 1 April 2008; Accepted 24 April 2008

### ABSTRACT

In recent years, the sol-gel technique has attracted increasing interest as a unique approach to immobilize biomolecules for bioanalytical applications as well as biochemical and biophysical studies. In this research, encapsulation of Horseradish peroxidase-Glucose oxidase (HRP-GOx) enzymes in silica aquagel from rice hull ash by sol-gel process has been carried out. In addition, the effect of several parameters (weight ratio of HRP to GOx, pH, temperature, sodium ion concentration) on enzyme activity was studied, as well. Rice hull ash, which was produced by ashing at 700 °C, was extracted its silica by NaOH solution 1 M at 100 °C for two hours to produce sodium silicate ( $\text{Na}_2\text{SiO}_3$ ) solution. The  $\text{Na}_2\text{SiO}_3$  solution with pH of 13 was added with a strong cation exchanger resin, to produce sol solution with the pH of 4. Encapsulation was emphasized by mixing sol solution and phosphate buffer pH 7 containing HRP-GOx solution at volume ratio of buffer to sol solution 1:5. The mixture was transferred into 96-microwell plate and was aged for 24 hours. Enzymatic reaction was carried out by adding chromogenic solution of phenol and 4-aminoantipyrine (4-AAP) and  $\beta$ -D-glucose solution (as substrate) into the microwell. Enzymatic activity was examined by measuring absorbance of product solution at 490 nm with ELISA reader. Result of enzymatic activity for encapsulated enzymes (SGE) was compared to that for free enzymes (EB). Results showed that at the investigated condition, HRP-GOx enzymes gave high activity at weight ratio of HRP to GOx 10:1 and pH 7 for both SGE and EB. Encapsulation caused the enzymes activity decrease to  $53.0 \pm 0.2$  %. However, SGE was observed to be more stable on pH and temperature changes than EB. Study on the effect of sodium concentration showed that the increase of sodium concentration from 0.10 to 0.37 M decreased the enzymatic activity to  $56 \pm 0.2$ %. Reusability test showed that the synthesized SGE was reusable with activity decrease of 60% within 23 days.

**Keywords:** rice hull ash, encapsulation, aquagel, horseradish peroxidase, glucose oxidase

### PENDAHULUAN

Pengembangan dan aplikasi sensor biokimia dan teknik bioanalisis lain saat ini sangat pesat dalam bidang kimia analitik modern. Langkah penting dalam riset ini adalah imobilisasi biomolekul aktif yang harus sederhana, cepat, dan menghasilkan material stabil di mana senyawa aktif yang diimobilisasikan tidak mudah lepas dari bahan pendukungnya [1]. Selain adsorpsi dan pengikatan secara kovalen, enkapsulasi biomolekul pada bahan pendukung, yaitu pemerangkapan fisik dalam bahan berpori menjadi sangat populer. Semula penggunaan bahan organik banyak dikenal sebagai material pendukung, namun saat ini bahan anorganik gelas yang diperoleh melalui proses sol-gel telah banyak dilaporkan untuk imobilisasi biomolekul, terutama enzim [2-4]. Proses sol-gel ini berlangsung sederhana karena berlangsung pada temperature rendah [5-9]. Material berpori ini juga memiliki banyak keuntungan seperti stabil secara mekanika, ukuran pori merata dan luas permukaan yang mudah terkontrol, preparasi dalam

berbagai bentuk dan yang paling penting meningkatkan stabilitas biomolekul yang terenkapsulasikan.

Matriks silika yang dibuat dengan proses sol-gel, memberi harapan untuk enkapsulasi biomolekul seperti enzim, antibodi, dan sel. Enzim lebih stabil dalam lingkungan yang terenkapsulasi pada matriks silika karena kerangka polimeriknya berkembang di sekitar biomolekul, membentuk kurungan dan mencegah enzim dari agregasi dan denaturasi [10]. Pemilihan silika sebagai matriks pendukung (*host matrix*) untuk enkapsulasi biomolekul dikarenakan selain mudah untuk disintesis, juga menunjukkan kekuatan mekanik dan stabilitas termal yang tinggi. Dengan demikian, kemungkinan aktivitas biologi dari enzim, antibodi, dan sel yang masuk dapat dipertahankan [11]. Dalam penelitian yang telah dilakukan sebelumnya, enkapsulasi protein atau sel ke dalam silika dilakukan melalui hidrolisis dan kondensasi dari ortosilikat, seperti tetrametil ortosilikat (TMOS) atau tetraetil ortosilikat (TEOS). Dengan menggunakan TMOS dan TEOS, akan diperoleh metanol atau etanol sebagai

\* Corresponding author. Tel/Fax : +62-274-545188  
Email address : nuryono\_mipa@ugm.ac.id

hasil samping, dan dalam jumlah besar dapat mengganggu aktivitas protein dan sel.

Untuk menjaga stabilitas dan aktivitas biomolekul dalam matriks silika dikembangkan enkapsulasi biomolekul dengan metode sol-gel yang menggunakan bahan dasar natrium silikat. Dengan bahan dasar ini, timbulnya alkohol dapat dihindari dan bersamaan itu pula enkapsulasi biomolekul dapat dilakukan pada pH netral serta aktivitas biologi dari biomolekul dapat dijaga. Proses tersebut terbagi menjadi dua langkah, yang pertama adalah preparasi sol dengan pH rendah menggunakan natrium silikat sebagai bahan dasar, kemudian langkah kedua adalah enkapsulasi enzim. Enzim dimasukkan dalam larutan bufer yang sesuai dan dimasukkan ke dalam sol dengan pH rendah [10,12].

Berbagai biomolekul telah dienkapsulasi untuk digunakan sebagai biosensor. Di antara enzim yang telah dienkapsulasikan adalah dehidrogenase laktat (LDH) [12,13]. Enzim LDH termasuk kelompok enzim oksidoreduktase dengan nikotinamida adenina dinukleotida ( $\text{NAD}^+$ ) sebagai kofaktor untuk mendeteksi L-laktat melalui pengukuran absorbansi NADH pada 340 nm. Penentuan L-laktat terus berkembang khususnya dalam bidang kimia klinis, perusahaan susu, industri anggur, bioteknologi, atau obat-obatan. Secara umum darah yang mengandung laktat dapat mengindikasikan adanya beberapa penyakit, seperti shock, penyakit jantung dan hati, diabetes dan pernafasan yang tidak normal. Pendeteksian yang murah, gampang dan selektif sangat dibutuhkan.

Oksidase glukosa (*Glucose oxidase*, GOx) merupakan enzim yang spesifik terhadap  $\beta$ -D-glukosa dan mengkatalisis oksidasi  $\beta$ -D-glukosa menjadi D-glukonolakton dan hidrogen peroksida ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) oleh oksigen. HRP merupakan protein heme dari tanaman lobak yang mereduksi  $\text{H}_2\text{O}_2$  ketika mengoksidasi kromofor seperti gabungan antara fenol dan 4-aminoantipirin (4-AAP) untuk membentuk produk berwarna yang dapat dideteksi dengan spektrofotometri UV/Vis. Enkapsulasi enzim GOx bersama-sama dengan *Horseradish peroxidase* (HRP) untuk sensor glukosa juga telah banyak dilakukan. Gill dan Ballesteros [14] melaporkan enkapsulasi Gox-HRP dalam poli(vinil alkohol-poli(fungsional-siloksan)- $\text{SiO}_2$ ) untuk sensor glukosa dengan metode deteksi spektrofotometri UV/Vis. Enkapsulasi enzim yang sama dalam silika gel dengan prekursor larutan natrium silikat dilaporkan mampu meningkatkan kestabilan enzim meskipun menurunkan aktivitas sampai 27 % untuk HRP [15]. Dalam artikel ini dilaporkan enkapsulasi gabungan enzim *Glucose oxidase* (GOx) dan *Horseradish peroxidase* (HRP) pada silika gel melalui proses sol-gel dengan natrium silikat dari pengolahan abu sekam padi digunakan sebagai prekursor. Kajian pengaruh enkapsulasi terhadap porositas silika, aktivitas enzim dan kestabilan disajikan pula.

## METODE PENELITIAN

### Bahan

Sekam padi diambil dari tempat penggilingan padi di daerah Klaten, Jawa Tengah. Natrium hidroksida (NaOH) pelet, resin penukar kation asam kuat Amberlite IR 120, kertas Whatman no. 42, natrium dihidrogen fosfat ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ), dinatrium hidrogen fosfat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ),  $\beta$ -D-glukosa, fenol, dan 4-aminoantipirin (4-AAP) dibeli dari Merck (Jerman) dan digunakan tanpa perlakuan sebelumnya. Enzim *Horseradish peroxidase* (HRP) dan *Glucose oxidase* (GOx) dibeli dari Sigma (USA).

### Alat

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain tungku pemanas (Ney M-525, Jerman), plat pemanas listrik yang dilengkapi pengadukan (*stirring hot plate*), plat *microwell* isi 96, pH meter (T.P.S. Digital titrator), spektrofotometer serapan atom (Perkin Elmer 3110, USA), timbangan elektrik (Mettler AS 200, Jerman), difraktometer sinar-X (Shimadzu XRD-600, Jepang), ELISA reader (Biorad, USA).

### Prosedur Kerja

#### **Penyiapan larutan sol natrium silikat ( $\text{Na}_2\text{SiO}_3$ ) dari abu sekam padi**

Sampel sekam dibakar di ruang terbuka sampai berwarna hitam kemudian diabukan dalam tungku penangas pada temperatur 700 °C selama 4 jam sehingga diperoleh abu sekam. Dengan mengacu pada prosedur yang dilaporkan oleh Kalapathy dan Proctor [16], seberat 2 g abu sekam didispersikan dalam 12 mL larutan NaOH 1 M sambil dipanaskan pada temperatur 100 °C selama 2 jam. Larutan disaring dengan kertas Whatman no. 42, residu yang tertahan dicuci dengan akuabides yang telah dipanaskan. Filtrat yang merupakan larutan  $\text{Na}_2\text{SiO}_3$ , selanjutnya diencerkan dengan akuabides hingga volumenya menjadi 25 mL. Sebagian larutan  $\text{Na}_2\text{SiO}_3$  ditentukan kadar silikanya dengan spektrofotometer serapan atom (SSA).

#### **Enkapsulasi dan karakterisasi enzim dalam silika gel**

Larutan sol  $\text{Na}_2\text{SiO}_3$  sebanyak 2,5 mL ditambah dengan 5 mL akuabides dan ditambahkan resin penukar kation asam kuat sampai pH larutan turun mendekati pH 4 dan 9. Resin dipisahkan dan filtrat ditambah dengan larutan bufer fosfat yang telah mengandung enzim HRP-GOx dengan rasio berat 1:5. Larutan dipindahkan ke dalam plat *microwell* untuk pembentukan gel (SGE). Untuk gel yang tidak

mengandung enzim (SG), larutan sol ditambah dengan larutan bufer tanpa enzim dengan rasio yang sama. Selanjutnya dilakukan penuaan (*aging*) selama 24 jam dan gel siap digunakan.

#### **Pengaruh rasio enzim HRP-GOx**

Seberat 2; 1,5; 1; 0,5 dan 0,2 mg enzim HRP dilarutkan dalam larutan bufer fosfat pH 7 sampai volumenya mencapai 1 mL. Enzim GOx seberat 0,1 mg dilarutkan dalam 1 mL bufer fosfat pH 7. Selanjutnya ditambah larutan sol dengan rasio 1:5, dimasukkan dalam plat *microwell* dan dilakukan penuaan (*aging*) untuk menghasilkan SGE. Untuk enzim bebas (EB), ke dalam tiap *microwell* ditambahkan enzim dengan berbagai rasio. Selanjutnya ke dalam setiap SGE dan EB ditambahkan kromogen dan substrat  $\beta$ -D-glukosa dan diukur absorbansi larutan berwarna yang terbentuk.

#### **Pengaruh pH**

Variasi pH dilakukan dengan memvariasikan pH larutan bufer fosfat yang digunakan untuk melarutkan enzim HRP dan GOx, yaitu mulai pH 5-8. Kemudian larutan bufer fosfat dengan berbagai nilai pH tersebut digunakan untuk melarutkan enzim. Untuk SGE, bufer fosfat pada nilai pH tertentu yang telah mengandung enzim ditambahkan pada larutan sol dengan rasio 1:5, dimasukkan dalam plat *microwell* dan dilakukan penuaan selama 24 jam. Setelah 24 jam ditambahkan substrat  $\beta$ -D-glukosa dan kromogen lalu diukur absorbansinya. Pekerjaan yang sama dilakukan untuk EB.

#### **Pengaruh temperatur**

Variasi temperatur yang digunakan adalah 25, 50 dan 90 °C. Larutan enzim bebas dan enzim terenkapsulasi dalam silika gel dipanaskan pada temperatur 50 dan 90°C selama 30 menit. Selanjutnya enzim bebas dimasukkan ke dalam SG. Untuk enzim bebas dan enzim terenkapsulasi masing-masing ditambah dengan kromogen dan substrat D-glukosa lalu diukur aktivitas enzimatisnya pada 490 nm.

#### **Pengaruh kandungan ion Na<sup>+</sup> dalam silika gel**

Larutan sol natrium silikat 12 mL ditambah dengan resin 1,437 g sehingga pH larutan menjadi 9, dan 2,0618 g sehingga pH turun menjadi 4. Selanjutnya ke dalam larutan sol ini ditambahkan larutan bufer fosfat yang telah mengandung enzim HRP-GOx. Larutan dipindahkan ke dalam plat *microwell* dan dilakukan penuaan selama 24 jam. Keesokan harinya dilakukan uji aktivitas enzim melalui pengukuran absorbansi produk reaksi pada 490 nm. Dengan asumsi bahwa Na<sup>+</sup> yang ada berasal dari larutan NaOH untuk destruksi abu sekam padi dan resin yang ditambahkan mampu mengadsorpsi Na<sup>+</sup> sesuai kapasitasnya maka konsentrasi Na<sup>+</sup> sisa yang ada dalam setiap *microwell* dapat dihitung, yaitu masing-masing 0,37 dan 0,10 M.

#### **Penggunaan kembali enzim terenkapsulasi.**

Larutan substrat dan pewarna dalam enzim terenkapsulasi yang telah selesai digunakan dibuang dan dikondisikan dengan larutan bufer fosfat 10 mM. Enzim terenkapsulasi digunakan kembali setelah dikondisikan selama 10, 15 dan 25 hari dari waktu enkapsulasi. Larutan bufer fosfat dibuang dan ditambahkan kembali 50  $\mu$ L kromogen dan 50  $\mu$ L substrat D-glukosa. Uji aktivitas enzim kembali dilakukan dan aktivitas yang dihasilkan dibandingkan dengan sebelumnya untuk mengetahui seberapa penurunan aktivitasnya.

### **HASIL DAN PEMBAHASAN**

#### **Penyiapan Larutan Natrium Silikat (Na<sub>2</sub>SiO<sub>3</sub>) dari Abu Sekam Padi**

Sekam padi dibakar di udara terbuka dan selanjutnya diabukan pada temperatur 700 °C. Tujuan pembakaran ini selain untuk mengurangi kandungan senyawa organik dalam sekam serta mempercepat dan menurunkan temperatur pengabuan yang diperlukan untuk menghasilkan abu sekam. Hasil karakterisasi dengan difraksi sinar-X yang dilakukan oleh Nuryono *et al.* [17] menunjukkan bahwa sampel memberikan puncak XRD di daerah  $2\theta = 20^\circ$  yang merupakan puncak khas untuk padatan amorf [18]. Pada abu dikarakterisasi untuk mengetahui tingkat kekristalannya. Hasil yang tidak ditampilkan menunjukkan bahwa terdapat puncak di sekitar Silika yang bersifat amorf ini lebih mudah terlarut atau terbelur dibandingkan silika dengan derajat kekristalanan yang tinggi.

Dari sekitar 73 g berat kering sekam, dihasilkan 18 g abu (24%) dan kandungan silika mencapai  $89 \pm 0,3\%$ . Abu sekam ini selanjutnya dicuci dengan asam klorida 0,1 M dan dibilas dengan akuabides untuk menghilangkan pengotor berupa oksida-oksida logam seperti Na<sub>2</sub>O, K<sub>2</sub>O dan CaO. Kandungan ion logam yang terlalu besar akan berpengaruh terhadap aktivitas enzim yang dienkapsulasikan ke dalam akuagel silika.

Ekstraksi silika dari abu sekam mengacu pada prosedur yang telah dilaporkan oleh Kamath dan Proctor yang didasarkan pada kelarutan silika amorf yang sangat tinggi pada pH di atas 10 [19]. Abu sekam didispersikan pada larutan NaOH 1 M disertai dengan pemanasan pada temperatur 100 °C selama 2 jam. Larutan selanjutnya disaring sehingga diperoleh larutan natrium silikat (Na<sub>2</sub>SiO<sub>3</sub>) yang akan digunakan selanjutnya untuk prekursor pembentukan akuagel silika.

#### **Enkapsulasi Enzim HRP-GOx dalam Akuagel Silika**

Enkapsulasi enzim dalam material akuagel silika dilakukan melalui proses sol-gel. Proses sol-gel

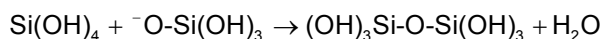
melibatkan transisi sistem dari fasa cair sol ke fasa padat gel. Tahapan yang dilalui pada proses sol-gel ini meliputi pembentukan larutan sol, pembentukan gel, dan penuaan (*aging*). Pembentukan gel melalui proses sol-gel dilakukan pada temperatur ruang. Hal ini memungkinkan untuk mengenkapsulasikan biomolekul, seperti enzim, ke dalam matriks akuagel silika dengan tetap mempertahankan aktivitas biologis biomolekul yang bersangkutan.

Sumber silika yang digunakan untuk proses sol-gel adalah larutan  $\text{Na}_2\text{SiO}_3$  hasil pengolahan abu sekam padi. Kelemahan yang muncul adalah adanya kation natrium yang ikut terjebak dalam gel dapat mempengaruhi aktivitas enzim. Oleh karena itu pengurangan konsentrasi  $\text{Na}^+$  perlu dilakukan dengan penambahan resin penukar kation bentuk  $\text{H}^+$ . Dua penambahan dengan jumlah resin berbeda dilakukan untuk mengkaji pengaruh konsentrasi  $\text{Na}^+$  terhadap aktivitas enzim yang akan dibahas di seksi selanjutnya.

Pada penelitian optimasi konsentrasi silika dalam larutan sol juga dilakukan karena laju pembentukan gel dipengaruhi oleh konsentrasi silika dalam larutan sol. Hasil menunjukkan bahwa larutan sol yang dapat digunakan untuk precursor enkapsulasi enzim adalah larutan dengan konsentrasi silika 0,56 M. Larutan dengan konsentrasi silika tinggi akan cepat membentuk gel pada penambahan sedikit  $\text{H}^+$  baik dari asam atau resin penukar kation. Sebaliknya pada konsentrasi yang rendah, larutan akan lambat membentuk gel dan dihasilkan gel yang lunak.

Enzim yang digunakan dalam penelitian ini adalah enzim gabungan *Horseradish peroxidase* (HRP) dan *Glucose oxidase* (GOx). Pada proses enkapsulasi, enzim gabungan HRP-GOx dilarutkan terlebih dahulu dalam bufer fosfat pH 7 dan kemudian dicampur dengan larutan sol pH 4, yang telah melalui proses pertukaran ion, untuk memfasilitasi pembentukan gel. Pada larutan sol pH 4, spesies Si yang utama berada dalam bentuk  $\text{Si}(\text{OH})_4$  dan pembentukan gel sangat lambat. Setelah larutan sol pH 4 dicampur dengan larutan bufer fosfat pH 7 yang mengandung enzim, larutan sol mengandung enzim ini segera dipindahkan ke dalam plat *microwell* isi

96. Pada plat *microwell* ini pembentukan gel terjadi dengan cepat dan dihasilkan akuagel yang transparan. Pembentukan gel sesungguhnya merupakan proses kebalikan dengan pelarutan silika, yaitu terjadi pembentukan ikatan siloksan. Pembentukan gel terjadi melalui reaksi kondensasi asam silikat yang melibatkan reaksi substitusi nukleofilik ( $\text{SN}_2$ ) dari atom oksigen pada gugus siloksi  $\equiv\text{Si}-\text{O}^-$  terhadap atom silikon pada gugus silanol  $\equiv\text{Si}-\text{OH}$ . Dari sini akan terbentuk ikatan siloksan  $\text{Si}-\text{O}-\text{Si}$ , bersamaan dengan dihasilkannya molekul air.

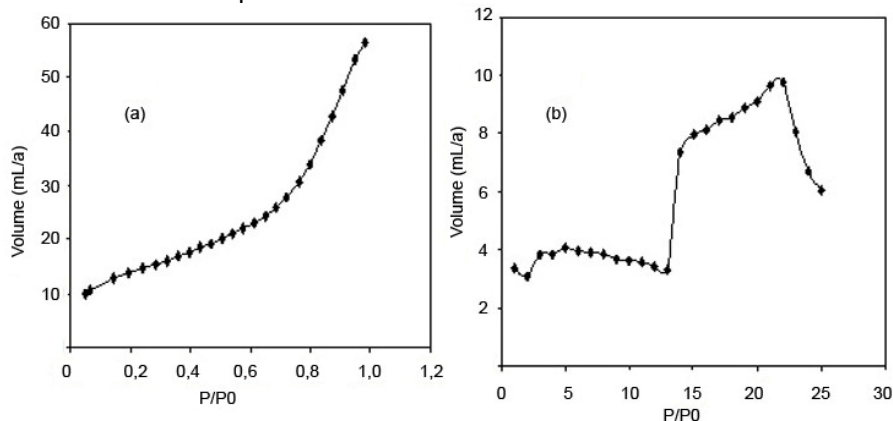


Setelah dimer terbentuk, reaksi kondensasi lanjutan antara dimer dengan monomer sangat cepat terjadikarena pembentukan ikatan siloksan  $\text{Si}-\text{O}-\text{Si}$  akan menjadikan atom Si menjadi semakin elektrofili sehingga ikatan dengan atom oksigen dari gugus siloksi akan terjadi dengan cepat.

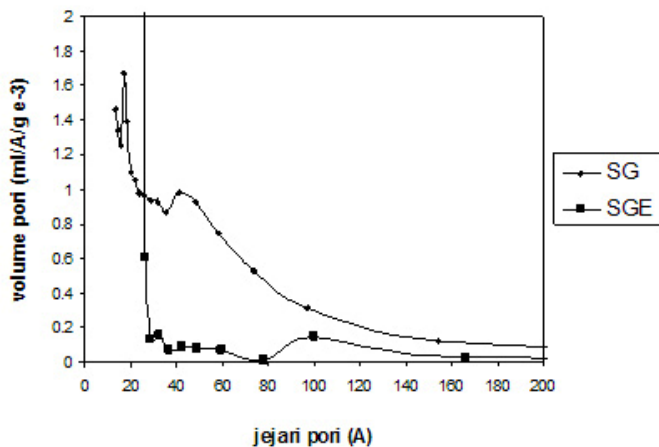
### Karakterisasi Enzim Terenkapsulasi

Pada penelitian ini, matriks akuagel silika / silika gel, baik yang mengandung enzim (SGE) maupun tidak (SG), dikarakterisasi dengan teknik adsorpsi nitrogen untuk memperoleh data tentang volume pori total, luas permukaan dan distribusi ukuran pori. Untuk melihat jenis pori yang terkandung dalam SG dan SGE, dilakukan analisis adsorpsi isoterm sampel dan hasilnya disajikan pada Gambar 1.

Dari Gambar 1 terlihat bahwa adsorpsi isoterm yang dihasilkan untuk SG merupakan adsorpsi isoterm tipe II sedangkan untuk SGE mengikuti tipe IV. Pada Gambar 2(b), untuk SGE, terdapat peningkatan penurunan volume secara tajam pada P/Po masing-masing 14 dan 23. Gejala ini mengindikasikan adanya perubahan struktur gel selama pengukuran. Hal ini wajar karena enzim merupakan senyawa organik yang tidak stabil terhadap tekanan sehingga dapat mengalami penataan ulang enzim bergantung pada tekanan yang dikenakan.



Gambar 1. Adsorpsi isoterm SG (a) dan SGE (b)



**Gambar 2.** Grafik distribusi ukuran pori gel

Pada Gambar 2 disajikan distribusi ukuran pori yang dimiliki oleh SG dan SGE. Dari gambar 2 terlihat bahwa terjadi pergeseran distribusi ukuran pori. Setelah enkapsulasi (ESG), distribusi ukuran pori menurun yang ditunjukkan dengan intensitas yang sangat tinggi pada daerah 20Å°.

Hal ini dimungkinkan karena enzim ditambahkan sebelum terjadi pembentukan gel sehingga matriks akuagel silika akan terbentuk di sekitar enzim, dan enzim bertindak seperti templat bagi pembentukan matriks. Karena enzim merupakan molekul yang relative besar maka pori untuk SGE yang terbentuk akan semakin besar karena akan menyesuaikan dengan ukuran enzim yang terenkapsulasi. Jika semakin banyak enzim yang terenkapsulasi maka jumlah pori yang ditempati oleh enzim juga semakin meningkat. Hal ini berakibat bergesernya nilai distribusi ukuran pori menjadi lebih kecil dibandingkan dengan silika gel yang tidak mengandung enzim.

### Aktivitas Enzim

Di dalam penelitian ini gabungan aktivitas enzim *glucose oxidase* (GOx) dan enzim *horseradish peroxidase* (GOx-HRP) dikaji melalui reaksi enzimatik  $\beta$ -D-glukosa. Reaksi enzimatik itu dapat dituliskan sebagai berikut:



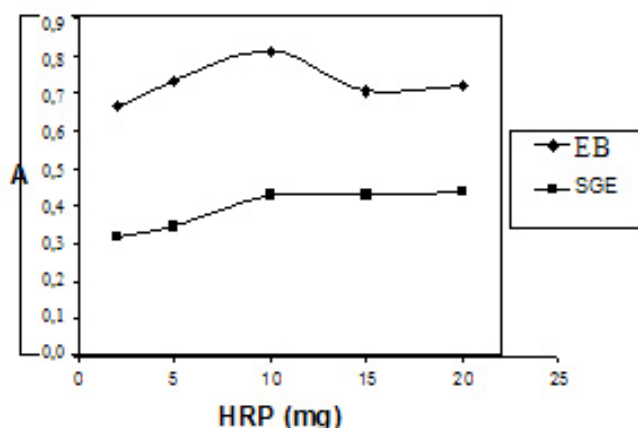
Pada reaksi enzimatik pertama, GOx mengkatalisis oksidasi  $\beta$ -D-glukosa menjadi  $\delta$ -D-glukonolakton dengan adanya molekul oksigen. Sebelum digunakan substrat D-glukosa dimutarotasikan agar terbentuk anomer  $\beta$ -D-glukosa karena GOx sangat spesifik terhadap anomer ini. Pada reaksi enzimatik ini, selain  $\delta$ -D-glukonolakton, juga dihasilkan hidrogen peroksida ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) sebagai produk. Untuk mengetahui aktivitas enzim GOx, bisa digunakan reaksi enzimatik lain yang digabung dengan kromogen untuk menghasilkan senyawa kompleks

berwarna sehingga aktivitas enzim GOx bisa ditentukan melalui metode spektrofotometri. Reaksi enzimatik lanjutan ini diperlukan karena produk yang dihasilkan dari reaksi enzimatik yang dikatalisis oleh GOx tidak menghasilkan kompleks berwarna sehingga tidak dapat ditentukan dengan metode spektrofotometri. Reaksi enzimatik gabungan yang digunakan adalah enzim HRP dengan larutan kromogen gabungan dari fenol dan 4-aminoantipirin (4-AAP). Dari reaksi enzimatik ini akan dihasilkan senyawa kuinonimin yang berwarna merah yang memberikan serapan pada 490 nm. Jadi, aktivitas enzim GOx-HRP ini ditunjukkan oleh banyaknya produk reaksi yang besarnya sebanding dengan absorbansi. Oleh karena itu, dalam penelitian ini absorbansi digunakan untuk ukuran aktivitas enzim. Pada penelitian ini dikaji pengaruh beberapa parameter terhadap aktivitas enzim bebas dan enzim terenkapsulasi.

### Rasio berat GOx-HRP

Dari reaksi enzimatik di atas terlihat bahwa jumlah kedua enzim menentukan produk akhir yang dihasilkan. Variasi rasio jumlah HRP terhadap GOx memegang peranan penting pada konsentrasi substrat dan zat perwarna tertentu. Semakin tinggi rasio HRP-GOx yang digunakan berarti  $\text{H}_2\text{O}_2$  yang dihasilkan oleh reaksi enzimatik glukosa dengan katalis enzim GOx akan bereaksi menghasilkan kuinonimin semakin banyak. Pada kondisi tertentu akan dicapai keadaan di mana peningkatan perbandingan tidak meningkatkan absorbansi. Hal ini terjadi pada kondisi di mana semua  $\text{H}_2\text{O}_2$  telah tereduksi sempurna oleh enzim HRP. Hasil kajian pengaruh berat HRP pada absorbansi larutan hasil untuk jumlah substrat, GOx dan pewarna konstan disajikan dalam Gambar 3.

Dari Gambar 3 terlihat bahwa nilai absorbansi yang terukur semakin tinggi dengan peningkatan jumlah HRP. Kecenderungan ini berlangsung terus sampai HRP 10 mg, atau pada rasio HRP-GOx 10:1, baik untuk EB maupun SGE. Ketika rasio ditingkatkan menjadi 15 dan 20, tidak terjadi peningkatan pada absorbansi. Sebagaimana telah disebutkan di muka, ketika semua  $\text{H}_2\text{O}_2$  yang dihasilkan oleh reaksi enzimatik GOx telah mengalami reaksi enzimatik yang dikatalisis oleh HRP, peningkatan jumlah HRP terhadap GOx tidak akan meningkatkan nilai absorbansi. Dari Gambar 4 juga dapat dilihat bahwa pada penggunaan HRP di atas 10 mg terdapat perbedaan pola kurva antara EB dan SGE, di mana untuk EB terjadi penurunan absorbansi pada peningkatan jumlah HRP. Hal ini diduga akibat adanya interaksi antara gugus aktif pada HRP dengan GOx yang dapat menghalangi kinerja enzim GOx dan menyebabkan hasil akhir yang diperoleh menjadi berkurang.



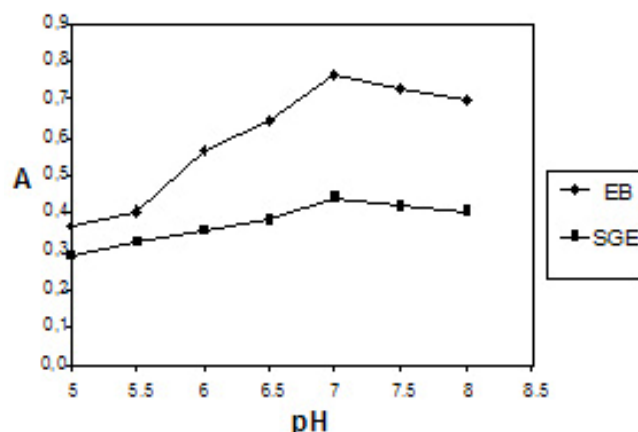
**Gambar 3.** Pengaruh jumlah HRP pada absorbansi pada reaksi enzimatik glukosa dengan enzim HRP-Gox bebas (EB) dan enzim HRP-GOx terenkapsulasi (SGE). Konsentrasi glukosa: 50 mM; buffer fosfat: 10 mM, pH 7; berat GOx 1 mg; zat pewarna: 2,46 mM 4-AAP dalam 0,172 M fenol; waktu reaksi: 6 menit

Dari Gambar 3 juga dapat ditunjukkan bahwa proses enkapsulasi menyebabkan aktivitas enzim menurun dan tersisa 53%. Penurunan aktivitas ini telah diprediksikan sebelumnya dan telah dilaporkan oleh beberapa peneliti sebelumnya. Bhatia *et al.* [15] melaporkan bahwa aktivitas HRP dan glukosa-6-fosfat dehidrogenase menurun masing-masing tinggal 60 % dan 10 % setelah dienkapsulasi pada silika gel. Aktivitas enzim lactase menurun signifikan (tinggal 7,5 %) setelah dienkapsulasi dalam matriks yang sama melalui proses sol-gel menggunakan prekursor TMOS [13]. Penurunan aktivitas setelah enkapsulasi ini disebabkan oleh adanya interaksi antara matriks silika dengan enzim. Interaksi ini berakibat pada perubahan konformasi dan sisi aktif enzim, yang semula bebas, menjadi tertentu karena interaksinya dengan matriks. Ketika jumlah sisi aktif yang digunakan untuk berinteraksi dengan substrat menurun, maka aktivitas enzim juga berkurang dan nilai absorbansi enzim terenkapsulasi juga menurun.

#### Pengaruh pH

Enzim, seperti halnya juga protein yang lain, akan bekerja pada kisaran nilai pH tertentu di mana kecepatan reaksi enzimatiknya akan mencapai maksimum. Oleh karena itu perlu diketahui pada kisaran pH berapa enzim HRP-GOx akan optimum bekerja. Variasi nilai pH dilakukan dengan memvariasikan pH bufer fosfat yang digunakan untuk melarutkan enzim HRP-GOx. Pada penelitian ini variasi nilai pH bufer fosfat yang digunakan mulai dari pH 5-8. Hasil analisis tentang pengaruh pH terhadap reaksi enzimatik HRP-GOx bebas dan terenkapsulasi disajikan pada Gambar 4.

Pada enzim bebas, nilai absorbansi mulai dari pH 5 terus meningkat, mencapai optimum pada pH 7 dan kemudian menurun kembali pada pH 7,5 dan pH 8. Hal ini berarti bahwa enzim gabungan HRP-GOx



**Gambar 4.** Pengaruh pH terhadap absorbansi terukur pada reaksi enzimatik glukosa dengan katalis EB dan SGE. Konsentrasi glukosa: 50 mM; rasio berat HRP-GOx 10:1; zat pewarna: 2,46 mM 4-AAP dalam 0,172 M fenol; waktu reaksi: 6 menit

memberikan aktivitas maksimum pada pH 7. Untuk enkapsulasi enzim HRP-GOx juga diperoleh kecenderungan yang hampir sama, di mana pH maksimum untuk aktivitas enzimatik juga berada pada pH 7. Fenomena yang menarik adalah perubahan pH tidak terlalu banyak mengubah aktivitas enzim yang terenkapsulasi. Hal ini menunjukkan stabilitas enzim terenkapsulasi lebih tinggi dibandingkan enzim bebas.

Residu asam amino histidin pada enzim merupakan residu asam amino yang bersifat polar tetapi hanya sedikit mengion di dalam larutan berair pada pH 7. Dengan adanya gugus yang hanya sedikit mengion ini, mengakibatkan nilai tetapan kesetimbangan,  $pK'$ , histidin cukup tinggi yaitu 7,4. Dengan  $pK' = 7,4$ , histidin akan memberikan daya bufer yang nyata pada pH 7. Hal ini juga sesuai dengan oleh Dixon *et al.* yang menyatakan bahwa tahapan penentu kecepatan reaksi pada reaksi yang dikatalisis oleh GOx adalah tahapan reaksi disosiasi  $H_2O_2$  untuk membentuk kompleks antara  $H_2O_2$  dengan enzim [20]. Tahapan ini dikontrol oleh gugus prototropik yaitu gugus imidazol, yang mempunyai nilai  $pK' 7,4$ .

#### Pengaruh Temperatur Perlakuan

Enzim dikenal sebagai senyawa protein tidak stabil terhadap perubahan temperatur. Dalam penelitian ini juga di lakukan kajian pengaruh enkapsulasi terhadap kestabilan enzim dengan adanya pemanasan. Sebelum digunakan, enzim dipanaskan selama 30 menit pada temperatur bervariasi. Hasil uji aktivitas enzim setelah mengalami pemanasan pada temperatur berbeda disajikan dalam Tabel 1.

Dari Tabel 1 dapat dilihat bahwa enkapsulasi sedikit meningkatkan stabilitas enzim terhadap pemanasan. Setelah pemanasan pada 50 °C, aktivitas EB enzim bebas mengalami sedikit penurunan,

**Tabel 1.** Pengaruh temperatur terhadap aktivitas EB dan SGE setelah dipanaskan selama 30 menit

Temperatur Pemanasan (°C)	Absorbansi	
	EB	SGE
25	0,813	0,471
50	0,791	0,494
90	0,006	0,025

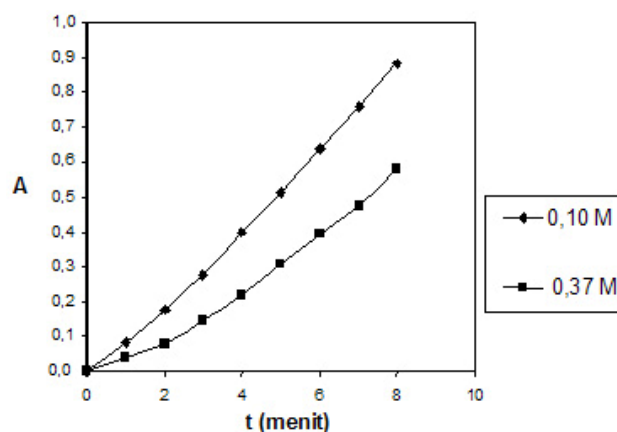
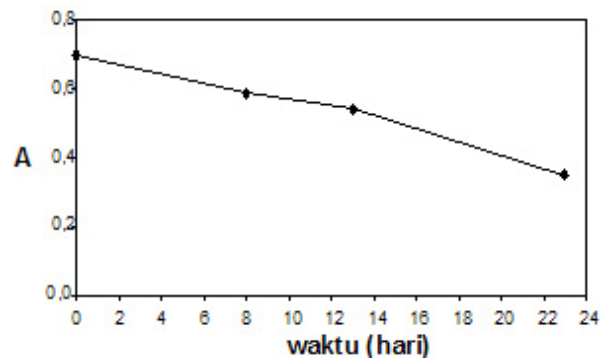
sedangkan untuk SGE aktivitasnya konstan atau cenderung sedikit meningkat.

Ketika enzim terenkapsulasi dalam gel, matriks gel tumbuh di sekitar enzim di mana enzim terkurung di dalam matriks. Dalam gel itu terdapat banyak gugus yang mengalami ikatan hidrogen di permukaan enzim, akan mengakibatkan terjadinya interaksi antara enzim dengan matriks yang mengandung gugus Si-O(H)-Si dan Si-OH. Proses enkapsulasi dengan metode sol-gel akan dihasilkan pori yang ukurannya sesuai dengan enzim yang terenkapsulasi. Ketika terjadi pemanasan, pori akan mengerut (*shrinkage*), tapi pengkerutan ini akan tetap sesuai dengan ukuran enzim dan keberadaan enzim akan mencegah runtuhnya pori. Konformasi enzim akan sedikit berubah karena beradaptasi dengan lingkungan yang baru. Dengan keberadaan struktur rangka yang kaku dari matriks akuagel silika maka mobilitas konformasi enzim juga akan dibatasi sehingga enzim yang terenkapsulasi akan lebih stabil terhadap pemanasan.

#### Kandungan ion natrium dalam akuagel silika

Penggunaan  $\text{Na}_2\text{SiO}_3$  pada pembuatan gel mengakibatkan keberadaan  $\text{Na}^+$  dalam gel tidak dapat dihindari. Untuk mengetahui seberapa besar pengaruh kandungan  $\text{Na}^+$  terhadap aktivitas enzim telah diuji aktivitas enzim yang telah terenkapsulasi dengan konsentrasi  $\text{Na}^+$  berbeda. Perbedaan konsentrasi  $\text{Na}^+$  ini diperoleh dari hasil perlakuan larutan sol dengan resin penukar kation yang jumlahnya berbeda. Perhitungan menemukan konsentrasi  $\text{Na}^+$  dalam larutan uji aktivitas adalah 0,1 M dan 0,37 M. Hasil disajikan dalam Gambar 5.

Dari Gambar 6 terlihat bahwa nilai absorbansi kompleks berwarna pada akuagel silika yang berasal dari larutan sol yang mengandung ion  $\text{Na}^+$  lebih banyak, yaitu larutan sol pada pH 9, lebih rendah jika dibandingkan dengan larutan sol pH 4. Enzim, seperti halnya protein yang lain, mempunyai muatan positif dan negatif seperti dari gugus karboksilat  $-\text{COO}^-$  atau dari gugus amino  $-\text{NH}_3^+$ . Pori matriks akuagel silika pada pH 7 akan bermuatan negatif sehingga memungkinkan muatan positif pada enzim berinteraksi dengan pori. Dengan kandungan ionik yang berlebih di dalam matriks karena keberadaan ion  $\text{Na}^+$  maka sisi aktif enzim yang akan digunakan untuk reaksi enzimatik semakin berkurang.

**Gambar 5.** Grafik absorbansi hasil reaksi enzimatik glukosa dengan SGE untuk interval waktu tertentu pada konsentrasi  $\text{Na}^+$  berbeda.**Gambar 6.** Penggunaan kembali enzim terenkapsulasi

Ketika terdapat oksigen, dari matriks akuagel silika, yang merupakan basa keras akan menjadikan  $\text{H}^+$  dari gugus amino, yang merupakan asam keras, akan lebih suka berinteraksi dengan oksigen. Demikian juga dengan keberadaan  $\text{Na}^+$  yang akan berinteraksi dengan oksigen dari gugus karboksilat. Semakin banyak kandungan ion  $\text{Na}^+$  dalam matriks akuagel silika maka interaksi dengan enzim juga semakin besar sehingga mengakibatkan sisi aktif untuk reaksi enzimatik berkurang dan absorbansi yang dihasilkan semakin rendah.

#### Penggunaan kembali enzim terenkapsulasi

Pada penelitian ini dicoba dikaji tentang stabilitas enzim dengan melihat aktivitasnya pada penggunaan ulang. Enzim terenkapsulasi yang telah digunakan untuk reaksi enzimatik dicuci dengan larutan bufer fosfat dan kemudian disimpan pada temperatur  $4\text{ }^\circ\text{C}$  selama beberapa hari untuk kemudian digunakan kembali. Hasil penelitian yang diperoleh disajikan dalam Gambar 6.

Dari grafik terlihat bahwa enzim terenkapsulasi memungkinkan untuk digunakan kembali jika dibandingkan dengan enzim bebas yang hanya dapat digunakan satu kali saja. Pada hari ke-23, terjadi penurunan aktivitas sampai 60% yang disebabkan karena terjadinya denaturasi enzim. Apabila digunakan

kontrol larutan standar glukosa dalam setiap aplikasi, maka enzim yang terenkapsulasi tersebut masih dapat digunakan secara berulang kali sebagai sensor, meskipun mengalami penurunan aktivitas, karena pada kondisi itu larutan berwarna masih dapat dideteksi.

## KESIMPULAN

Dari penelitian diperoleh hasil bahwa enzim gabungan HRP-GOx berhasil dienkapsulasi dalam silica melalui proses sol-gel menggunakan precursor larutan natrium silikat hasil pengolahan abu sekam padi. Pada kondisi yang dikaji, enzim HRP-GOx menunjukkan aktivitas enzim tertinggi pada perbandingan HRP terhadap GOx 10:1 dan pH 7, baik untuk enzim yang terenkapsulasi maupun untuk enzim bebas. Enkapsulasi mengakibatkan peningkatan stabilitas terhadap perubahan pH dan temperatur dengan mengalami penurunan aktivitas enzim berkisar 49 %. Dari kajian pengaruh konsentrasi ion Na<sup>+</sup> dalam gel menunjukkan bahwa kenaikan konsentrasi natrium dari 0,10 M menjadi 0,37 M mengakibatkan penurunan aktivitas enzim terenkapsulasi sampai 56%. Enzim yang terenkapsulasi dalam silika gel dapat digunakan secara berulang kali meskipun aktivitas menurun 60% dalam 23 hari karena pada kondisi itu produk yang dihasilkan masih dapat terdeteksi.

## UCAPAN TERIMA KASIH

Secara khusus peneliti mengucapkan terimakasih kepada Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi Departemen Pendidikan Nasional Republik Indonesia melalui Program Penelitian Hibah Bersaing yang telah mendanai penelitian ini dan Yevie Zuhardiansari yang telah membantu dalam pengumpulan data penelitian.

## DAFTAR PUSTAKA

1. Cass, T., and Ligler F.S., (Eds.), 1998, *Immobilized Biomolecules in Analysis: A Practical Approach*, Oxford University Press, Oxford, GB.
2. Braun, S., Rappoport, S., Zusman, R., Avnir, D., and Ottolenghi, M., 1990, *Mater. Lett.*, 10, 1.
3. Avnir, D., Braun, S., Lev, O., and Ottolenghi, M., 1994, *Chem. Mater.*, 6, 1605.
4. Avnir, D., 1995, *Acc. Chem. Res.*, 28, 328.
5. Lan, E.H., Dunn, B., and Zink, J.I., 2005, *Methods in Molecular Biology*, in: T. Vo-Dinh (Ed.), *Protein Nanotechnology, Protocols, Instrumentation and Applications*, 300, Humana Press Inc., Totowa, p.53.
6. Gill, I., and Ballesteros, A., 1998, *J. Am. Chem. Soc.*, 120, 8575.
7. Collinson, M.M., 1999, *Crit. Rev. Anal. Chem.*, 29, 289.
8. Gill, I., and Ballesteros, A., 2000, *TIBTECH*, 18, 282.
9. Jin, W., and Brennan, J.D.F., 2002, *Anal. Chim. Acta.*, 461, 1.
10. Bhatia, R.B., and Brinker, C.J., 2000, *Chem. Mater.*, 12, 2434-2441
11. Nguyen, D.T., Mark S., Bruce D., and Jeffrey I.Z., 2002, *Chem. Mater.*, 14 4300-4306.
12. Nuryono, Hindryawati N., Astuti E., and Narsito, 2005, *Study on Analysis of Lactate in Blood Serum by Spectrophotometric Method using Lactate Dehydrogenase Enzyme Encapsulated in Rice Hull Ash Derived Silika*, Presented in Regional Conference on Pharmaceutical and Biomedical Analysis Held By School of Pharmacy, ITB, Bandung 15-16 September 20
13. Chia-I. Li., Yi-Hua Lin, Cheng-Ling Shih, Jeng-Pyng Tsaur, and lai-Kwan Chau, 2002, *Biosensors and Bioelectronics*, 17, 323-330.
14. Gill, I., and Ballesteros, A., 1998, *J. Am. Chem. Soc.*, 120, 8587-8598
15. Bhatia, R.B., Brinker, C.J., Gupta A.K., and Singh, A.K., 2000, *Chem. Mater.* 12, 2434-2441.
16. Kalapathy, U., dan Proctor, A., 2000, *Bioresource Technology*, 73, 257-262.,
17. Nuryono, Narsito, and Astuti, E., 2004, *Review Kimia*, 7(2), 67-81
18. Proctor, A., 1990, *JAOACS*, 67(9), 576-584
19. Kamath, S.R., and Proctor, A., 1998, *Cereal Chemistry*, 75, 484-487.
20. Dixon, M., Tipton, K.F., Thorne, C.J.R., and Webb, E.C., 1979, *Enzymes*, Edisi 3, Longman, New York.