

Ekstrak Metanol *Rhizopora apiculata* Sebagai Biosensor Penghambatan Aktivitas Tirosinase Menggunakan Elektrode Pasta Karbon Termodifikasi Ferosena Dan Zeolit

Penulis Zulhan Arif^{1*}, Maryani Yunita¹, Latifah Kosim Darusman^{1,2}

Afiliasi ¹Departemen Kimia Institut Pertanian Bogor
²Pusat Studi Biofarmaka Tropika, Lembaga Penelitian dan Pengabdian kepada Masyarakat-Institut Pertanian Bogor

Kata Kunci

- ➔ Elektrode pasta karbon
- ➔ Ferosena
- ➔ Inhibitor tirosinase
- ➔ *Rhizopora apiculata*
- ➔ Zeolit

Diterima 15 Oktober 2017
Direvisi 3 Desember 2017
Disetujui 8 Februari 2018

* Penulis Koresponding

Zulhan Arif
Jl Tanjung Kampus IPB
Darmaga, Bogor, 16680
zulhanarif@ipb.ac.id/zulhanarif@apps.ipb.ac.id

ABSTRAK

Ekstrak metanol tanaman *Rhizopora apiculata* telah dibuat untuk biosensor inhibitor enzim tirosinase menggunakan elektrode pasta karbon dengan termodifikasi zeolit dan mediator ferosena. Enzim tirosinase merupakan enzim yang mengkatalisis 2 tahap reaksi biosintesis melanin pada mamalia dan berperan dalam reaksi pencokelatan enzimatis. Enzim diimobilisasi pada permukaan transduser untuk menjaga aktivitas enzim. Aktivitas tirosinase diukur menggunakan substrat L-DOPA. Kondisi optimum aktivitas tirosinase berdasarkan pengoptimalan respon adalah tirosinase 50 U/mL dan zeolit 150 mg/mL dalam larutan penyangga fosfat. Penggunaan mediator ferosena dan material penyangga zeolit meningkatkan aktivitas tirosinase. Nilai KM_{app} dan $I_{maks\ app}$ tirosinase ditentukan dengan metode Lineweaver-Burk. Nilai KM_{app} dan $I_{maks\ app}$ sebesar 6.04 mM dan sebesar 6.42 mM. Biosensor menggunakan zeolit sebagai matriks imobilisasi dan ferosena sebagai mediator mempunyai stabilitas respon sampai 2 jam, dengan penurunan aktivitas sebesar 19%.

PENDAHULUAN

Tirosinase (EC 1. 14. 18. 1) merupakan enzim yang berperan dalam biosintesis melanin dengan mengkatalisis reaksi hidrosilasi monofenol menjadi *o*-difenol (reaksi monofenolase) dan oksidasi *o*-difenol menjadi *o*-kuinon (reaksi difenolase). Substrat yang berperan dalam reaksi monofenolase dan difenolase yaitu L-tirosin. Tirosinase banyak ditemukan pada mamalia, buah-buahan, dan juga di dalam proses pencoklatan jamur secara enzimatis (Chang 2009). Saat ini telah banyak dilakukan penelitian tentang senyawa inhibitor tirosinase yang berasal dari bahan alam. Arung *et al.* (2006) menemukan Artocarpanone dari *Artocarpus heterophyllus* memiliki kemampuan menghambat biosintesis melanin. Batubara *et al.* (2010) telah melakukan penelitian terhadap tanaman obat Indonesia dari 35 spesies dan diperoleh bahwa ekstrak metanol dari kayu *Rhizophora sp* memiliki kemampuan inhibisi yang cukup baik terhadap tirosinase.



Senyawa-senyawa inhibitor tirosinase telah banyak ditemukan baik senyawa bahan alam maupun sintetik. Penghambatan enzim tirosinase ditentukan oleh keberadaan tirosine dan L-3,4-dihidroksifenilalanina (L-DOPA) sebagai substrat serta pembentukan dopakrom. Senyawa yang berasal dari bahan alam telah dilaporkan dapat menghambat enzim tirosinase, seperti senyawa yang berasal dari golongan flavonol (kuersetin, mirisetin, kaempferol), golongan isoflavon, flavanol, kalkon, dan stilbenoid (Chang 2009). Penghambatan pembentukan melanin umumnya dilakukan dengan menghambat aktivitas tirosinase (Hartanti dan Setiawan 2009). Penentuan aktivitas hambatan suatu enzim umumnya digunakan dengan metode *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) (Sheng et al. 2009) atau spektrofotometri (Arung et al. 2006). Metode tersebut memiliki beberapa kekurangan diantaranya ialah memerlukan bahan kimia dalam jumlah besar serta penanganan yang cukup rumit dalam preparasi contoh.

Metode alternatif yang dapat digunakan untuk pengukuran aktivitas inhibisi enzim yaitu biosensor. Biosensor adalah suatu piranti yang memanfaatkan interaksi hayati untuk mendeteksi analat (Serra 2010). Biosensor memiliki beberapa keunggulan yaitu instrumentasinya sederhana, tidak mahal, serta memiliki sensitivitas dan selektivitas tinggi dengan pendeteksian yang cepat (Zhang et al. 2011) memanfaatkan enzim. Metode ini memerlukan proses penstabilan/imobilisasasi enzim pada permukaan biosensor. Imobilisasi enzim yang dapat dilakukan diantaranya pengikatan kimia (*covalent binding*), penjebakan (*entrapment*), taut silang (*cross-link*), serta adsorpsi (Serra 2010). Pada penelitian yang telah dilakukan pembuatan biosensor yang digunakan berupa elektrode pasta karbon dengan modifikasi zeolit dan ekstrak metanol dari tanaman famili *Rhizophoraceae* dengan mengimobilisasi enzim tirosinase. Pemanfaatan zeolit alam, suatu kristal silikat aluminat, dapat meningkatkan aktivitas biosensor karena keberadaan pori dari zeolit yang ada dan dapat bersifat semi konduktor. Ferosena digunakan sebagai mediator karena peranan yang sangat baik dalam penghantaran elektron sehingga memudahkan dalam berbagai proses oksidasi dan reduksi suatu senyawa. Ferosena juga punya sifat fisik yang stabil, elektrofil superaromatik, tingkat oksidasi menengah dan reversibel, kelarutan yang baik di pelarut non-air, dan stabil di udara terbuka (Astruc 2016).

METODE

Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah, *Rhizopora apiculata* diperoleh dari Makassar, Sulawesi selatan, enzim tirosinase (Sigma-aldrich, St Louis, Amerika, 333 unit/mL dalam larutan penyangga fosfat), zeolit (asal Cikalong), grafit (Merck, Darmstadt, Jerman), ferosena (Merck, Darmstadt, Jerman), parafin cair (Merck, Darmstadt, Jerman), dimetil sulfoksida (DMSO) (Merck, Darmstadt, Jerman), larutan larutan penyangga fosfat pH 7 dan pH 6.5, membran dialisis (Sigma-aldrich, St Louis, Amerika), L-DOPA (Sigma-aldrich, St Louis, Amerika) dan L-tirosin (Sigma-aldrich, St Louis, Amerika), metanol (Merck, Darmstadt, Jerman), dan gliserol (Merck, Darmstadt, Jerman). Semua bahan kimia, terkecuali sampel dac zeolit, berkualitas GR (*grade reagent*).

Alat

Alat dan instrumen yang akan digunakan adalah Potensiostat–Galvanostat yang dilengkapi perangkat lunak Echem v2.1.0 (eDAQ, New South Wales, Australia), laminar *air flow*, Spektroskopi UV-Pharmaspec 1700 (Shidmazu, Kyoto, Japan), pipet mikro, tabung gelas elektrode (diameter dalam tabung 3 mm, ketebalan lapisan pasta karbon 5 mm), sel elektrokimia tiga elektrode, dan Minitab 16 (Pennsylvania, Amerika).

Preparasi dan Ekstraksi Tanaman *Rhizopora apiculata* (Batubara et al. 2010)

Sampel dikeringkan dan dihaluskan menjadi serbuk lolos saringan 60 *mesh*. Maserasi dilakukan dengan metanol 50% dengan nisbah 1:10 (1 g = 10 mL metanol) masing-masing selama 12 jam sebanyak tiga kali ulangan. Ekstrak yang diperoleh disaring dengan menggunakan kertas saring Whatman nomor 1 dan dipekatkan dengan penguap putar pada suhu 30 °C.

Uji Aktivitas Inhibitor Tirosinase (Batubara et al. 2010)

Ekstrak sampel dilarutkan dalam pelarut DMSO hingga konsentrasi 20 mg/mL. Larutan ini selanjutnya disebut sebagai larutan stok. Larutan stok disiapkan dengan melarutkan ekstrak pekat hingga diperoleh konsentrasi 2000 µg/mL dalam 50 mM Kalium buffer fosfat (pH 6.5). Dilakukan pengujian ekstrak dengan rentang konsentrasi 7.89-2000 µg/mL. Asam kojat digunakan sebagai kontrol positif dan dilakukan pengujian pada rentang konsentrasi 7.8125 -2000 µg/mL. Pada pelat tetes 96 sumur, masing-masing



dimasukkan sebanyak 70 μL ekstrak ditambahkan 30 μL tirosinase (333 units/mL dalam buffer fosfat) kemudian campuran diinkubasi pada suhu ruang selama 5 menit. Setelah inkubasi sebanyak 110 μL substrat (2 mM L-tirosin atau 12 mM L-DOPA) ditambahkan pada masing-masing sumur dan diinkubasi selama 30 menit pada suhu ruang. Dilakukan pengukuran absorbansi larutan masing-masing sumur dengan menggunakan *micro plate reader* pada panjang gelombang 510 nm untuk menentukan persen inhibisi dan konsentrasi hambat 50 % (LC_{50}). Persen inhibisi ditentukan dengan persamaan berikut:

$$\% \text{ Inhibisi} = \frac{A-B}{B} \times 100\% \quad (\text{Batubara et al. 2010})$$

Keterangan:

A = Absorbans sampel tanpa penambahan ekstrak

B = Absorbans sampel dengan penambahan ekstrak

Preparasi Zeolit Alam (Arif 2011)

Aktivasi zeolit dilakukan dengan dua cara yaitu aktivasi fisika dan aktivasi kimia. Zeolit yang digunakan pada penelitian diperoleh dari daerah Cicalong. Batuan zeolit dihancurkan dengan penggilingan hingga diperoleh ukuran lolos saringan 200 *mesh*. Serbuk zeolit kemudian dicuci dengan akuades dan dikeringkan pada suhu 105 °C selama 3 jam. Sebanyak 50 gram zeolit selanjutnya direndam dengan menggunakan asam klorida (HCl) 4 M selama 90 menit, selanjutnya dienaptuangkan dan disaring. Zeolit hasil penyaringan dicuci dengan menggunakan akuades hingga pH netral dan bebas klorida.

Preparasi Elektrode Pasta Karbon Termodifikasi Ferosena (Trivadilla 2011)

Elektrode dibuat dengan melarutkan 3 mg ferosena dalam 1 mL DMSO dan ke dalam larutan tersebut ditambahkan 100 mg grafit. Campuran didiamkan selama 2 jam. Setelah 2 jam pelarut dikeringkan menggunakan pengering vakum, sehingga diperoleh grafit termodifikasi mediator ferosena. Grafit termodifikasi dicampur dengan 35 μL paraffin cair hingga membentuk pasta karbon dan dimasukkan ke dalam badan elektrode. Permukaan elektrode dihaluskan dan dibersihkan dengan digosok menggunakan kertas minyak.

Imobilisasi Enzim (Saiapina et al. 2011)

Matriks nanokomposit divariasikan pada selang massa zeolit 50-250 mg yang disuspensikan dalam 1 mL

buffer fosfat yang mengandung enzim dengan rentang konsentrasi 50-250 U/mL. Sebanyak 15 μL ekstrak tirosinase dalam larutan penyangga fosfat pH 6.8 diteteskan pada permukaan elektrode pasta karbon didiamkan hingga pelarutnya menguap, dilapisi dengan membran dialisis, ditutup dengan jaring nilon, dan diikat dengan parafilm. Elektrode dapat langsung digunakan untuk pengukuran metode voltametri siklik. Elektrode direndam dalam larutan penyangga pH 7.5 pada suhu 4 °C ketika tidak digunakan untuk memberikan keadaan yang sama dengan lingkungan sebenarnya.

Optimasi Aktivitas Tirosinase

Optimasi yang dilakukan adalah menggunakan rentang konsentrasi enzim tirosinase 50-250 U/mL dan massa zeolit 200 *mesh* dengan rentang 25-250 mg. Elektrode pasta karbon yang telah termodifikasi ferosena dan enzim tirosina dengan rentang yang telah ditentukan dan pemodifikasi zeolit pada massa yang telah ditentukan untuk modifikasi digunakan untuk mengukur substrat L-DOPA. Metode yang digunakan untuk pengoptimuman aktivitas tirosinase adalah *Response Surface Method (RSM)*. Metode ini dilakukan dengan cara memasukkan kombinasi faktor-faktor peubah bebas pada perangkat lunak statistika Minitab 16. Selanjutnya percobaan dilakukan sesuai dengan kombinasi yang dihasilkan untuk mendapatkan nilai optimum masing-masing peubah.

Pengukuran Elektrokimia (Wang et al. 2006)

Pengukuran elektrokimia dilakukan dengan metode voltametri siklik dengan menggunakan eDAQ Potensiostat–Galvanostat yang dilengkapi perangkat lunak Echem v2.1.0. Elektrode yang digunakan adalah elektrode Ag/AgCl sebagai elektrode rujukan, platina sebagai *counter* dan elektrode pasta karbon termodifikasi sebagai elektrode kerja. Parameter pengukuran dibuat sebagai berikut: *Mode: Cyclic; Initial: -800 mV; Final: -800 mV; Rate: 250 mV/s; Step W: 20 ms Upper E: 1000 mV; Lower E: -800 mV; Range: 5 V.*

Pengukuran dilakukan pada setiap elektrode pada suhu 25 °C dengan menggunakan sel elektrokimia yang diisi dengan 5 mL larutan penyangga fosfat 5 mM (pH 7). Elektrode yang telah disiapkan dimasukan dalam sel elektrokimia lalu dilakukan pengukuran dengan menggunakan parameter seperti di atas. Sinyal yang dihasilkan dicatat sebagai blangko, kemudian substrat



berupa L-DOPA dengan konsentrasi 0-5 mM dimasukan dalam sel elektrokimia dan dibiarkan selama 30 menit kemudian dilakukan pengukuran arus kembali. Pengukuran dilanjutkan dengan menggunakan ekstrak metanol tanaman *Rhizophoraceae* sebagai inhibitor. Ekstrak ditambahkan dengan rentang konsentrasi 250 - 2000 µg/mL sebanyak 35 µL dan dilakukan pengukuran arus kembali.

Penentuan Stabilitas Respon Biosensor

Stabilitas elektrode dilakukan dengan pengukuran secara langsung pada elektrode yang telah dibuat dengan imobilisasi enzim tirosinase pada permukaan elektrode. Nilai aktivitas yang diperoleh pada pengukuran awal dianggap aktivitas 100%. Aktivitas diukur ulang pada jam ke 0, 1, 2, 4, 8 dan 16. Aktivitas tirosinase ditentukan dengan persamaan:

$$\text{Aktivitas} = \frac{I_{\text{saat ke-jam}} (\mu\text{A})}{I_{\text{saat awal}} (\mu\text{A})} \times 100\% \text{ (Bisswanger 2008)}$$

HASIL DAN PEMBAHASAN

Ekstraksi *R. apiculata*

Ekstraksi tanaman *Rhizophora apiculata* dengan teknik maserasi metanol memberikan hasil rendemen 8.11%. Hasil yang didapatkan sesuai dengan yang telah dilakukan oleh Abdullah (2011) dengan rendemen ekstraksi pelarut metanol akar dan batang *Rhizophora apiculata* berturut-turut sebesar 8.85%, dan 8.53%. Pelarut yang digunakan pada maserasi adalah metanol. Penggunaan pelarut yang digunakan bersifat polar bertujuan untuk mengekstrak senyawa kepolaran sedang sampai senyawa dengan tingkat kepolaran tinggi dalam sampel dengan rendemen sebanyak-banyaknya.

Aktivasi Zeolit

Aktivasi zeolit dilakukan secara fisik dengan melakukan pengecilan ukuran butir dan pengayakan

hingga ukuran 200 mesh dan pemanasan pada suhu 300 °C bertujuan untuk menghilangkan pengotor-pengotor organik, memperbesar pori, dan memperluas permukaan. Keluarnya air dari pori-pori zeolit menyebabkan pori-pori zeolit menjadi kosong dan dapat digunakan sebagai adsorben. Aktivasi secara kimia dilakukan dengan penambahan asam kuat HCl 4 M. Aktivasi asam ini mengakibatkan hilangnya pengotor anorganik pada zeolit melalui pertukaran kation H⁺. Penambahan asam menyebabkan terjadinya proses dealuminasi pada zeolit. Dealuminasi merupakan proses penggantian aluminium dengan hidrogen yang melibatkan perubahan struktur aluminosilikat Si-O-Al menjadi struktur silika yang berbentuk silanol -Si-OH (Herald et al. 2003).

Aktivitas Inhibitor Ekstrak *Rhizophora apiculata*

Uji aktivitas inhibisi digunakan untuk mengetahui daya inhibisi senyawa bioaktif pada ekstrak metanol batang bakau. Aktivitas inhibisi ekstrak bakau ditentukan dengan metode spektrofotometri. Aktivitas inhibitor ekstrak metanol batang bakau menunjukkan nilai IC₅₀ sebesar 1690 µg/mL (difenolase) dan 2266 µg/mL (monofenolase). Abdullah (2011) memperoleh aktivitas inhibitor terbaik ekstrak bakau diperoleh dari ekstrak metanol kulit batang dengan nilai IC₅₀ 1116.65 µg/mL (difenolase). Ekstrak bakau menghambat aktivitas tirosinase melalui mekanisme penghambatan campuran, yaitu kompetitif dan nonkompetitif.

Optimasi Aktivitas Tirosinase

Optimasi konsentrasi enzim dan zeolit pada elektrode menggunakan perangkat lunak Minitab 16.2.1 metode respon permukaan (RSM) dengan melakukan unit eksperimen seperti terdapat pada Tabel 1. Optimasi dilakukan pada elektrode termodifikasi ferosena (Tir/Zeolit/PCf) dan nonmodifikasi ferosena (Tir/Zeolit/PC). Optimasi

Tabel 1 Optimasi enzim tirosinase dan zeolit dari RSM

| Modifikasi | | Mediator ferosena | | | | Tanpa Mediator | | | |
|--------------|-------------|--------------------|-------|------------------------|------|--------------------|-------|------------------------|------|
| Enzim (U/mL) | Zeolit (mg) | Arus Puncak I (µA) | | E (mV) Vs Ag/AgCl (mV) | | Arus Puncak I (µA) | | E (mV) Vs Ag/AgCl (mV) | |
| | | Ipa | Ipc | Epa | Epc | Ipa | Ipc | Epa | Epc |
| 79 | 221 | 3.44 | -2.44 | 745 | -250 | 4.54 | -5.01 | 665 | -220 |
| 150 | 150 | 2.70 | -0.44 | 830 | -275 | 4.3 | -3.99 | 720 | -240 |
| 250 | 150 | 10.76 | -8.01 | 660 | -115 | 5.26 | -4.81 | 605 | -65 |
| 50 | 150 | 7.94 | -5.55 | 620 | -370 | 4.19 | -2.12 | 670 | -210 |
| 150 | 250 | 1.04 | -1.02 | 620 | -60 | 0.30 | -0.64 | 995 | -640 |



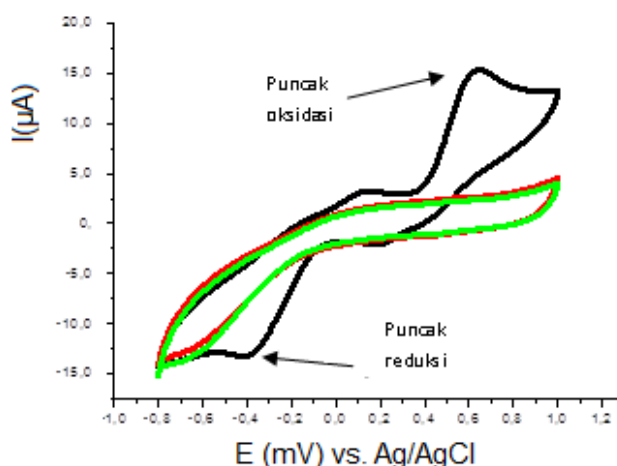
didapatkan pada elektrode Tir/Zeolit/PCf konsentrasi Tirosinase sebesar 50 U/mL dengan zeolit sebesar 150 mg. Arus puncak anode pada kondisi tersebut adalah 7.85 μ A pada potensial 620 mV. Hasil ini lebih kecil jika dibandingkan dengan Wang *et al.* (2013) yaitu respon arus sebesar 492 μ A dengan mengimobilisasi tirosinase 15 mg/ml pada nanokomposit karbon taut silang polianilin, Kim dan Yong-Lee (2002) melaporkan respon arus sebesar 200 μ A dengan mengimobilisasi tirosinase 1 mg/mL pada film sol-gel silikat/Nafion dengan substrat fenol. Perbedaan respon arus ini disebabkan perbedaan matriks penyangga serta mediator yang digunakan.

Reaksi enzimatik relatif sulit terjadi sehingga diperlukan suatu mediator yang dapat mengalirkan arus dari reaksi enzimatik menuju elektrode pasta karbon (Trivadilla 2011). Gambar 1 menunjukkan voltammogram siklik hasil optimasi zeolit 150 mg/mL dan tirosinase 50 U/mL. Voltammogram siklik menunjukkan bahwa tanpa keberadaan substrat dan waktu inkubasi tidak dihasilkan puncak reduksi dan oksidasi. Reaksi enzimatik antara enzim tirosinase dan substrat L-DOPA memerlukan waktu inkubasi (dipenelitian ini digunakan waktu 30 menit waktu inkubasi). Mediator ferosena yang digunakan pada penelitian ini dapat mentransfer elektron dari reaksi enzimatik menuju permukaan elektrode tetapi tidak dapat mengkatalisis reaksi enzim dan substrat sehingga perlu waktu respons terlebih dahulu agar enzim mampu bereaksi dengan substrat.

Tirosinase merupakan enzim yang berperan dalam proses oksidasi senyawa fenolik. L-DOPA merupakan salah satu substrat dari tirosinase yang dapat dioksidasi menjadi dopakuinon. Potensial oksidasi L-DOPA yang diperoleh pada kondisi optimum sebesar 620 mV (Tabel 1). Eslami *et al.* (2012) memperoleh potensial oksidasi pada 745 mV. Dopakuinon ini selanjutnya akan direduksi kembali oleh enzim yang diimobilisasi pada permukaan elektrode pasta karbon yang ditunjukkan oleh puncak katodik (Gambar 1) dengan arus sebesar -5.55 μ A pada potensial -370 mV seperti yang tertera pada Tabel 1. Eslami *et al.* 2012 menjelaskan reaksi antara tirosinase dan L-DOPA berlangsung seperti Gambar 2.

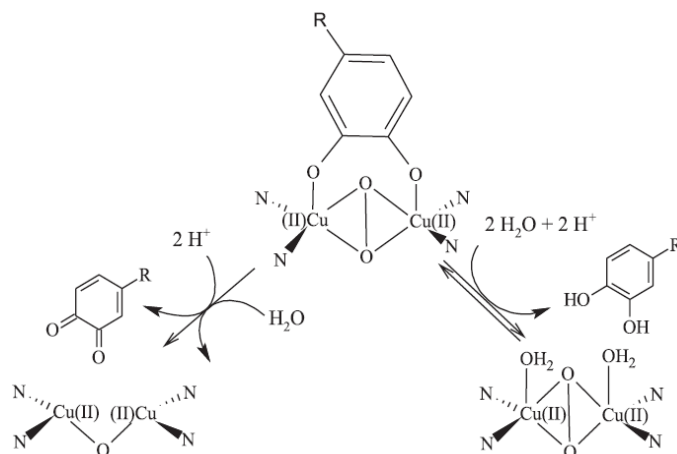
Pengaruh Media Imobilisasi Enzim

Enzim merupakan material yang memiliki selektivitas dan sensitivitas yang tinggi dalam keadaan bebas, namun sangat sensitif terhadap perubahan pH dan suhu lingkungan. Untuk mempertahankan sifat enzim maka dilakukan suatu proses imobilisasi. Pada penelitian ini dilakukan imobilisasi enzim tirosinase pada elektrode pasta karbon yang dimodifikasi menggunakan zeolit. Modifikasi yang dilakukan dengan membandingkan tirosinase diimobilisasi dengan zeolit kemudian ditetaskan di atas permukaan pasta karbon termodifikasi ferosena (Tir/zeolit/ PCf), tirosinase diimobilisasi dengan zeolit ditetaskan pada permukaan elektrode pasta karbon (Tir/zeolit/PC) dan tirosinase ditetaskan pada permukaan elektrode pasta karbon



Gambar 1 Voltammogram siklik hasil pengoptimasian enzim dan zeolit (— penyangga; — Tir/DOPA; — Tir/DOPA 30 menit)





Gambar 2 Reaksi oksidasi L-Dopa menjadi dopakuinon (Eslami et al. 2012)

Tabel 2 Puncak arus dan potensial modifikasi media imobilisasi

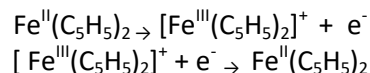
| Modifikasi | Arus Puncak (μA) | | E (mV) Vs Ag/AgCl (mV) | |
|----------------|-------------------------------|----------|------------------------|----------|
| | I_{pa} | I_{pc} | E_{pa} | E_{pc} |
| Tir/PC | 2.85 | -2.85 | 865 | -445 |
| Tir/Zeolit/PC | 8.34 | -2.12 | 690 | -210 |
| Tir/Zeolit/PCf | 13.76 | -5.55 | 650 | -375 |

(Tir/PC). Tabel 2 menunjukkan elektrode Tir/zeolit/PCf memiliki arus yang lebih besar dari Tir/ Zeolit/PC dan lebih besar dibandingkan Tir/PC dengan nilai berturut-turut sebesar 13.76 μA , 8.34 μA , dan 2.85 μA .

Penggunaan mediator ferosena pada modifikasi elektrode pasta karbon (Tir/zeolit/PCf) menghasilkan respon arus yang dihasilkan lebih besar dibanding elektrode tanpa modifikasi (Tir/zeolit/PC) atau pun yang tanpa modifikasi. Puncak-puncak arus yang terdeteksi dari media-media imobilisasi dapat dilihat di Gambar 3.

Pada elektrode dengan modifikasi ferosena terjadi transfer elektron melalui mediator ferosena sehingga respon arus yang dihasilkan lebih besar. Potensial puncak memberikan informasi tentang identitas analat dan proses kinetika oksidasi atau reduksi, sedangkan arus puncak memberikan informasi tentang konsentrasi analat dan stabilitas spesi (Trivadilla 2011). Arus puncak anode pada penyapuan maju (*forward scan*) berhubungan dengan oksidasi inti ferosena (Fc) menjadi ion ferosenium Fc^+ ($[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{C}_5\text{H}_5)_2]^+$), sedangkan penyapuan balik (*reverse scan*) pada arus puncak katode muncul akibat reduksi Fc^+ menjadi Fc

(Trivadilla 2011). Siklus reaksi redoks tersebut mengikuti persamaan reaksi berikut:

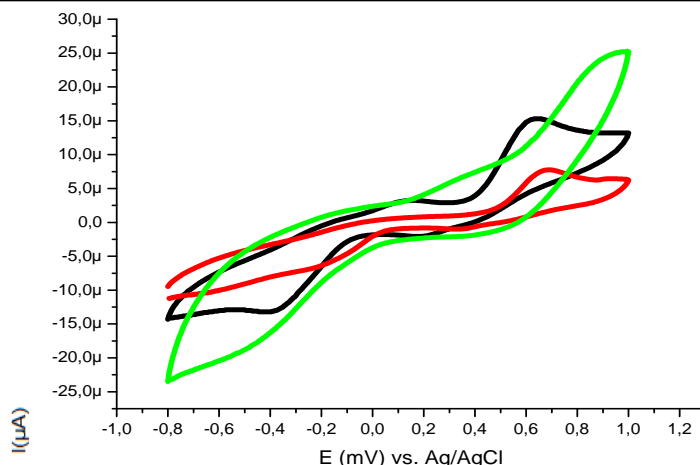


Imobilisasi enzim dengan menggunakan matriks penyangga zeolit dapat meningkatkan arus puncak yang dihasilkan. Penggunaan zeolit sebagai material penyangga pada biosensor dapat meningkatkan aktivitas enzim terimobilisasi ditandai dengan terjadinya peningkatan arus puncak oksidasi pada voltammogram (Gambar 3). Enzim yang telah teradsorpsi pada permukaan zeolit dapat meningkatkan aktivitas dan stabilitas biosensor. Kemampuan zeolit dalam menjaga efektivitas biosensor disebabkan sifatnya yang hidrofilik oleh adanya gugus –OH disekitar pori sehingga baik digunakan sebagai matriks imobilisasi enzim.

Penentuan Kinerja Elektrode

Ekstrak metanol kulit batang bakau diketahui mempunyai aktivitas inhibisi tirosinase. Enzim tirosinase yang diimobilisasi dengan zeolit pada permukaan elektrode pasta karbon akan mengoksidasi L-DOPA menjadi dopakuinon ditandai dengan

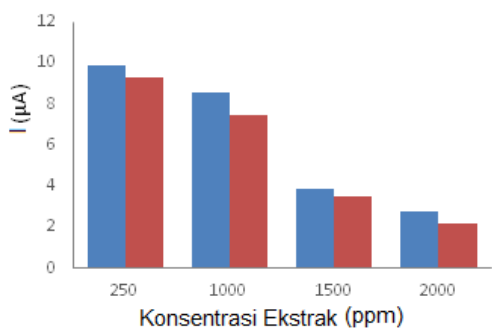




Gambar 3 Voltammogram puncak arus anode dan katode (— Tir/PC; — Tir/zeolit/PC; — Tir/zeolit/PCf)

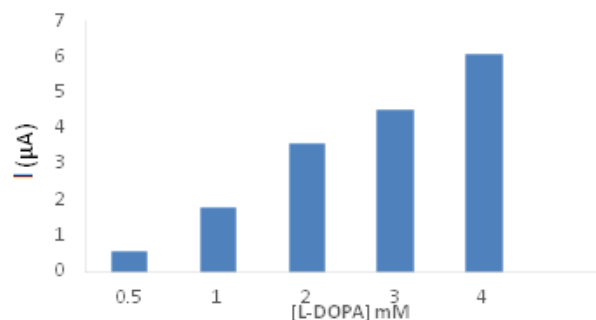
munculnya puncak arus anode dan katode dengan metode voltametri siklik. Penambahan suatu inhibitor tirosinase akan menghambat reaksi oksidasi L-DOPA menjadi dopakuinon sehingga puncak arus reduksi yang dihasilkan akan berkurang. Tinggi arus puncak yang terbaca dari voltammogram siklik menyatakan besarnya konsentrasi analat dalam pengukuran (Trivadilla 2011).

Ekstrak metanol *Rhizopora apiculata* yang digunakan pada penelitian ini dengan rentang konsentrasi 250-2000 ppm. Pada penambahan substrat sebesar 250 ppm arus puncak oksidasi turun dari 9.91 μA menjadi 9.28 μA dan pada penambahan ekstrak 2000 ppm arus berubah dari 2.78 μA menjadi 2.15 μA . Terjadinya penurunan arus pada voltammogram patut diduga adanya inhibitor tirosinase dari ekstrak metanol tanaman *Rhizopora apiculata* sehingga menurunkan aktivitas tirosinase dalam mengoksidasi L-DOPA (Gambar 4).



Gambar 4 Arus puncak aktivitas tirosinase (■ tanpa inhibitor; ■ dengan inhibitor).

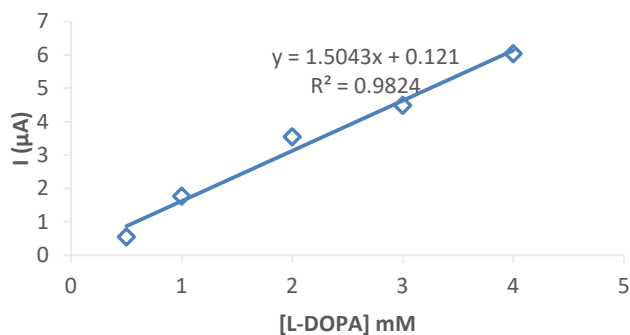
Kinerja biosensor yang dihasilkan juga ditentukan oleh kinetika enzim terimobilisasi pada elektrode. Kinetika enzim menunjukkan kespesifikan enzim dalam bereaksi dengan substrat. Aktivitas tirosinase diukur dengan variasi konsentrasi L-DOPA antara 0.5-4 mM. Proses pengukuran dilakukan pada suhu ruang dan kondisi optimum. Gambar 5 menunjukkan hubungan antara konsentrasi L-DOPA dengan aktivitas tirosinase pada rentang konsentrasi dari 0.5-4 mM. Peningkatan konsentrasi substrat meningkatkan aktivitas tirosinase secara linear hingga konsentrasi 4 mM. Penambahan konsentrasi substrat mencapai maksimum pada konsentrasi tertentu. Pada konsentrasi maksimum penambahan substrat tidak meningkatkan aktivitas enzim. Hal ini disebabkan karena penambahan substrat yang lebih banyak dapat menghambat aktivitas enzim dan semua tapak aktif enzim telah bereaksi dengan substrat (Arnaut *et al.* 2007). Keadaan maksimum diperoleh pada konsentrasi substrat 4 mM dengan arus oksidasi sebesar 6.04 μA .



Gambar 5 Arus puncak aktivitas tirosinase dengan perubahan konsentrasi L-DOPA



Penentuan rentang linear pengukuran bertujuan untuk mengetahui daerah kerja maksimum dari elektrode yang digunakan. Kisaran linearitas substrat L-DOPA ditunjukkan oleh Gambar 6. Berdasarkan gambar tersebut rentang linearitas diperoleh pada rentang konsentrasi 0.5-4 mM. Persamaan regresi yang diperoleh $y = 1.5043x + 0.121$ dengan nilai R^2 yang diperoleh pada pengukuran aktivitas tirosinase sebesar 98.24%.



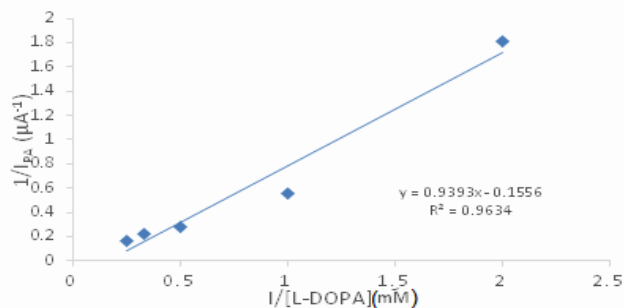
Gambar 6 Rentang linier antara L-DOPA dengan tirosinase

Parameter kinetika enzim terimobilisasi adalah K_{Mapp} dan laju reaksi nyata $V_{maks\ app}$ yang dianalogikan dengan arus maksimum nyata ($I_{maks\ app}$). Kinetika enzim mengikuti alur Lineweaver – Burk dengan nilai R sebesar 0.9634 (Gambar 7). Nilai K_{Mapp} menunjukkan afinitas atau daya ikat enzim tirosinase terhadap substrat L-DOPA. Nilai K_{Mapp} semakin kecil maka enzim akan semakin kuat mengikat substrat sehingga untuk menjenuhkan enzim hanya memerlukan substrat yang lebih sedikit. Nilai K_{Mapp} pada penelitian ini sebesar 6.04 mM dan $I_{maks\ app}$ sebesar 6.42 mA. Hasil yang diperoleh jauh lebih besar jika dibandingkan dengan hasil yang didapatkan oleh Liu *et al.* (2003) yang mengimobilisasi tirosinase pada elektrode pasta karbon termodifikasi emas yang memperoleh nilai K_{Mapp} sebesar 53×10^{-3} mM dan nilai $I_{maks\ app}$ sebesar 12.3×10^{-3} mA. Perbedaan ini dapat disebabkan oleh perbedaan jenis material penyangga yang digunakan sebagai matriks pengimobilisasi dan teknik pengimobilisasi yang digunakan.

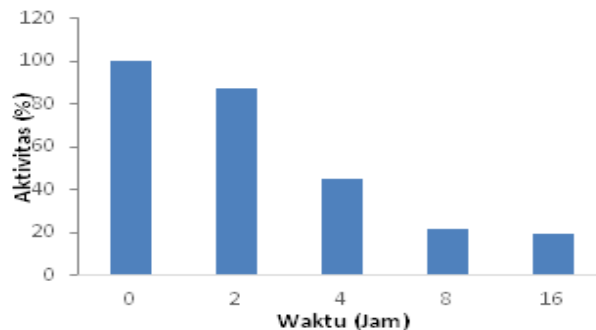
Stabilitas Respon Biosensor

Penggunaan voltametri juga dapat dilakukan untuk menentukan stabilitas dari aktivitas tirosinase yang diimobilisasi permukaan elektrode pasta karbon termodifikasi zeolit dan mediator ferosena. Stabilitas

biosensor ditentukan dengan pengukuran pada waktu ke-0 hingga 16 jam. Hasil pengukuran stabilitas menunjukkan semakin lama penyimpanan aktivitas biosensor yang dihasilkan semakin menurun, sampai mencapai keadaan stabil mulai jam ke-8 (Gambar 8).



Gambar 7 Alur Lineweaver-Burk substrat L-DOPA dengan tirosinase



Gambar 8 Pengaruh penyimpanan biosensor terhadap kestabilan aktivitas

Aktivitas biosensor mengalami penurunan hingga 19% pada jam ke-2 penyimpanan. Penyimpanan biosensor selama 8 jam mengakibatkan aktivitas tersisa 19%. Penurunan aktivitas biosensor disebabkan karena penggunaan secara terus menerus. Ketika biosensor digunakan secara terus menerus seluruh tapak aktif enzim pada biosensor telah jenuh oleh substrat, sehingga ketika biosensor digunakan kembali enzim tidak mampu mengikat substrat dan bereaksi membentuk produk (Bisswanger 2008).

SIMPULAN

Penggunaan zeolit sebagai matriks pengimobilisasi dan mediator ferosena dapat meningkatkan aktivitas biosensor. Kondisi optimum diperoleh pada konsentrasi enzim 50 U/mL dan 150 mg zeolit. Kinetika enzim terimobilisasi mengikuti kinetika enzim Lineweaver & Burk dengan nilai K_{Mapp} sebesar 6.04 mM dan $I_{maks\ app}$



6.42 mM. Penurunan aktivitas biosensor berbanding lurus dengan waktu penyimpanan

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih diberikan untuk Dr Irmanida Batubara, M.Si. dan Pusat Studi Biofarmaka Tropika LPPM IPB atas bantuan serbuk tanaman *Rizhoporaceae* dan preparasi awal sampel.

DAFTAR PUSTAKA

- Abdullah. 2011. Potensi Bakau *Rhizophora apiculata* BL sebagai inhibitor tirosinase dan antioksidan [tesis]. Bogor (ID): Sekolah Pascasarjana, Institut Pertanian Bogor.
- Arif Z. 2011. Karakterisasi dan modifikasi zeolit alam sebagai bahan media pendeteksi studi kasus: kromium heksavalen [tesis]. Bogor (ID): Sekolah Pascasarjana, Institut Pertanian Bogor.
- Arnaut L, Formosinho S, Burrows H. 2007. *Chemical Kinetics from Molecular Structure to Chemical Reactivity*. Amsterdam (ND):Elsevier.
- Arung ET, Shimizu K, Kondo R. 2006. Inhibitory effect of artocarpone from *Artocarpus heterophyllus* on melanin biosynthesis. *Journal of Biology*. 29:1966-1969.
- Astruc D. 2016. Why is ferrocene is so exceptional?. *European Journal of Inorganic Chemistry*. 0000: 1-25. DOI: 10.1002/ejic.201600983.
- Batubara I, Darusman LK, Mitsunaga T, Rahminiwati M, Djauhari E. 2010. Potency of Indonesia medicinal plants as tyrosinase inhibitor and antioxidants agent. *Journal of Biological Science*. 10:138-144.
- Bisswanger H. 2008. *Enzyme Kinetics Principles and Methods*. Weinheim (DE): Wiley-VCH.
- Chang TS. 2009. An update review of tyrosinase inhibitors. *Journal of Molecular Sciences*. 10:2440-2473. doi:10.3390/ijms10062440.
- Eslami M, Zare H R, Namazian M. 2012. Thermodynamic parameters of electrochemical oxidation of l-DOPA: Experimental and Theoretical Studies. *Journal of Physical Chemistry. B* 41:116. doi: 10.1021/jp3054229.
- Hartanti L, Setiawan KH. 2009. Inhibitory of some synthetic cinnamic acid derivatives towards tyrosinase enzyme. *Indonesian Journal of Chemistry*. 9(1):158-168.
- Heraldy E, His Yam SW, Sulistiono. 2003. Characterization and activation zeolite from ponorogo. *Indonesian Journal of chemistry*. 3 (2): 91-97.
- Liu S, JiuHong Y, Huangxian J. 2003. Renewable phenol biosensor based on a tyrosinase-colloidal gold modified carbon paste electrode. *Journal of Electroanalytical Chemistry*. 540: 61-67.
- Kim MA, Yoong-Lee W. 2002. Amperometric phenol biosensor based on sol-gel silicate/Nafion composite film. *Analytica Chimica Acta*. 479:43-150. doi:10.1016/S0003-2670(02)01538-6.
- Saiapina OY, Pyeshkova VM, Soldatkin OO, Melnik VG, Akata Kurç B, Walcarius A, Dzyadevych SV, Jaffrezic-Renault N. 2011. Conductometric enzyme biosensors based on natural zeolit clinoptilolite for urea determination. *Materials and Science Engineering C*. 31:1490-1497. doi:10.1016/j.msec.2011.06.003
- Serra PA. 2010. *Biosensor*. Croatia (HR): Intech.
- Sheng, W, Xua, T, Maa H, Wang X, Li Q, Li J. 2009. Development of an indirect competitive enzyme linked immunosorbent assay for detection of danofloxacin Residues in Beef, Chicken and Pork Meats. *Journal of Food And Agricultural Immunology*. 20:35-47
- Trivadila. 2011. Biosensor antioksidan menggunakan superoksida dismutase *Deinococcus radiodurans* diimobilisasi pada permukaan elektrode pasta karbon dan parameter kinetiknya. Tesis. Bogor (ID): Sekolah Pascasarjana, Institut Pertanian Bogor.
- Wang B, Zheng J, Hae Y, Sheng Q. 2013. A sandwich-type phenolic biosensor based on tyrosinase embedding into single-wall carbon nanotubes and polyaniline nanocomposites. *Sensors and Actuators B: Chemical*. 186 :417- 422.
- Wang X, ChenL, Xia S, Zhu Z, Zhao J, Chovelomad J. 2006. Tyrosinase biosensor based on interdigitated electrodes for herbicides determination. *Journal of Electrochemistry Sciences*. 1:55-61.
- Zhang Q, Qu Y, Zhou J, Zhang X, Zhou H, Ma Q, Li X. 2011. Optimization of 2,3-dihydroxybiphenyl 1,2-dioxygenase expression and its application for biosensor. *Bioresource Technology*. 102:10553-10560.

