

**LAPORAN AKHIR
PENELITIAN UNGGULAN PERGURUAN TINGGI (U)**



**BIOSENSOR UNTUK MENDETEKSI CEMARAN PANGAN DALAM PRODUK
PERTANIAN**

Tahun ke 1 dari rencana 3 tahun

Ketua/Anggota Tim

Dr. Ani Mulyasuryani, MS NIDN : 0028066305

Dr. SasangkaPrasetyawan, MSi NIDN : 0004046310

Ir. Moch. Dhofir, MT NIDN : 0001076011

Dibiayai oleh :
Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi,
Kementerian Pendidikan dan Kebudayaan, Melalui DIPA Universitas Brawijaya
Nomor : DIPA-023.04.2.414989/2013, Tanggal 5 Desember 2012, dan berdasarkan
SK Rektor Universitas Brawijaya Nomor : 153/SK/2013 tanggal 28 Maret 2013

**UNIVERSITAS BRAWIJAYA
November 2013**

HALAMAN PENGESAHAN

Judul Kegiatan : Biosensor untuk Mendeteksi Cemaran Pangan dalam Produk Pertanian
Peneliti / Pelaksana
Nama Lengkap : Dr. ANI MULYASURYANI MS.
NIDN : 0028066305
Jabatan Fungsional :
Program Studi : Kimia
Nomor HP : 08179603028
Surel (e-mail) : mulyasuryani@yahoo.com
Anggota Peneliti (1)
Nama Lengkap : SASANGKA PRASETYAWAN
NIDN : 0004046310
Perguruan Tinggi : UNIVERSITAS BRAWIJAYA
Anggota Peneliti (2)
Nama Lengkap : Ir. MOCHAMMAD DHOFIR MT
NIDN : 0001076011
Perguruan Tinggi : UNIVERSITAS BRAWIJAYA
Institusi Mitra (jika ada)
Nama Institusi Mitra :
Alamat :
Penanggung Jawab :
Tahun Pelaksanaan : Tahun ke 1 dari rencana 3 tahun
Biaya Tahun Berjalan : Rp. 245.000.000,00
Biaya Keseluruhan : Rp. 757.232.000,00



Mengetujui
Dekan FMIPA

(Prof. Dr. Marjono, M.Phil)

NIP/NIK 196211161988031004



Mengetujui,
Ketua PPM

(Prof. Dr. Ir. Siti Chuzaimi, MS)

NIP/NIK 195305141980022001

Malang, 25 - 11 - 2013,

Ketua Peneliti,

(Dr. ANI MULYASURYANI MS.)

NIP/NIK 196306281991032001

ABSTRAK

Pada ini penelitian telah dibuat biosensor untuk mendeteksi kadar pestisida organofosfat, yang didasarkan pada reaksi hidrolisis organofosfat oleh adanya organofosfat hidrolase. Hidrolisis organofosfat menghasilkan ion H^+ yang dapat meningkatkan daya hantar larutan, yang disebut sebagai biosensor konduktometri. Pada penelitian ini ada tiga hal yang dikembangkan yaitu :

- a. Isolasi dan pemurnian OPH dari *Pseudomonas putida*. Pemurnian dilakukan secara fraksinasi pada 0 - 45% dan 45 - 65% dengan ammonium sulfat dilanjutkan dengan dialisis.
- b. Mengembangkan alat ukur (konduktometer)
- c. Modifikasi elektrode SPCE dengan membran kitosan. Dipelajari ukuran elektrode 3; 5 dan 7 mm² dengan metode immobilisasi OPH secara ikatan silang. Organofosfat yang diuji adalah diazinon, malation, klorpyrifos, dan profenofos.

Hasil penelitian adalah sebagai berikut :

- a. Konsentrasi protein enzim hasil isolasi pada fraksi 0-45% ammonium sulfat sebesar 6444 ppm dan 7865 ppm pada fraksi 45 - 65% dengan ammonium sulfat.
- b. Konduktometer yang dihasilkan dapat mengukur signal pada kisaran 200 – 4000 μS
- c. Ukuran elektroda berpengaruh terhadap signal yang dihasilkan, kepekaan optimum dihasilkan pada elektroda 5 mm². Batas deteksi biosensor terhadap empat pestisida organofosfat kurang dari 0,05 ppm.

ABSTRACT

The research made of biosensor for detection of organophosphate pesticides, the biosensor is based on hydrolysis reaction of organophosphate by organophosphate hydrolase. Hydrolysis of organophosphate result H^+ ion, which is increasing conductivity of solution, that is conductometric biosensor. The aim of research is :

- a. Isolation and purification of organophosphate hydrolase (OPH) from *Pseudomonas putida*. Purification has been done by ammonium sulfate fractionation 0 – 45% and 45 – 65%, and continued by dialysis.
- b. Developing of electronic device or conductometer
- c. Modification of Screen Printed Electrode (SPCE) by chitosan membrane. The research was developed surface area of electrode, 3; 5; and 7 mm², and enzyme immobilization method is crosslink method. The organophosphate samples are diazinone, malation, chlorpyrifos, and profenofos.

The results of research :

- a. The concentration of protein enzyme is 6444 ppm for isolated from 0-45% fractionation and 7856 ppm for isolated from 45-65% fractionation.
- b. Electronic device has result signal at 200 – 4000 μS
- c. The area surface of electrode affecting to the signal, the optimum sensitivity resulted at 5 mm² surface area. Limit of detection of biosensor to the organophosphate pesticides less than 0.05 ppm.

RINGKASAN

Kebutuhan akan pangan yang semakin meningkat mendorong peningkatan produktivitas hasil pertanian. Untuk itu, penggunaan pestisida sudah tidak bisa dihindari lagi bahkan cenderung berlebihan, sehingga dapat menimbulkan cemaran pangan pada produk pertanian. Departemen Pertanian menganjurkan pemakaian pestisida ini karena sifat organofosfat yang mudah hilang di alam. Meskipun demikian residu pestisida organofosfat pada manusia dapat menimbulkan keracunan baik akut maupun kronis, hal ini disebabkan oleh sifat akumulatif dari residu pestisida organofosfat. Oleh karena itu diperlukan suatu perangkat atau metoda untuk menentukan residu pestisida dalam hasil pertanian terutama sayuran. Dalam upaya menyediakan metoda yang sederhana, murah dan bisa dilakukan di lapangan, pada penelitian ini akan dibuat biosensor untuk mendeteksi kadar pestisida organofosfat. Biosensor merupakan alat yang mengkombinasikan molekul biologis dengan suatu transduser dan detektor (electronic device). Biosensor ini dibuat atas dasar reaksi hidrolisis organofosfat yang dikatalisis enzim organofosfat hidrolase menghasilkan ion H^+ yang dapat meningkatkan daya hantar larutan, yang disebut sebagai biosensor konduktometri. Pembuatan biosensor konduktometri untuk mendeteksi kadar residu pestisida telah dikembangkan oleh tim peneliti yang terdibuat dari platina (Pt) yang dilapisi membrane kitosan. Biosensor yang dihasilkan mempunyai kinerja optimum pada pH 9 dengan kisaran konsentrasi yang dapat dideteksi 20 – 30 ppm dengan kepekaan 32 $\mu S/ppm$. Biosensor ini masih kurang peka dan belum dapat mencapai kisaran konsentrasi 0,1 ppm sebagai batasan maksimum residu pestisida. Untuk meningkatkan kepekaan penelitian dilanjutkan dengan menggunakan *screen printed carbon electrode* (SPCE) yang dimodifikasi dengan Bovin Serum Albumin (BSA)-glutaraldehyd sebagai media immobilisasi organofosfat hidrolase. Biosensor menghasilkan kinerja optimum pada pH pengukuran 8,5 dengan waktu respon 45 detik. Pada kondisi optimum sensitivitas 28,04 $\mu S/ppm$ dan limit deteksi 0,18 ppm dan konsentrasi pestisida maksimum yang dapat diukur adalah 1 ppm. Biosensor telah diterapkan untuk mengukur residu pestisida dalam beberapa sampel sayuran. Kekurangan dari biosensor ini adalah batas deteksi masih belum memadai (lebih kecil dari 0,1 ppm). Pada penelitian ini ada tiga hal yang dikembangkan dengan melibatkan 3 kelompok peneliti yaitu :

- a. Mengembangkan metoda isolasi dan pemurnian OPH dari *Pseudomonas putida*.
Pemurnian dilakukan secara fraksinasi pada 0 - 45% dan 45 - 65% dengan ammonium sulfat dilanjutkan dengan dialisis.
- b. Mengembangkan elektrode SPCE yang dikombinasikan dengan membran kitosan. Dipelajari ukuran elektrode 3; 5 dan 7 mm^2 dengan metode immobilisasi OPH secara ikatan silang. Organofosfat yang diuji adalah dizinon, malation, klorpyrifos, dan profenofos.
- c. Mengembangkan alat ukur (konduktometer).

Hasil penelitian adalah sebagai berikut :

- a. Konsentrasi protein enzim hasil isolasi pada fraksi 0-45% ammonium sulfat sebesar 6444 ppm dan 7865 ppm pada fraksi 45 - 65% dengan ammonium sulfat.
- b. Konduktometer yang dihasilkan dapat mengukur signal pada kisaran 200 – 4000 μS

- c. Ukuran elektroda berpengaruh terhadap signal yang dihasilkan, kepekaan optimum dihasilkan pada elektroda 5 mm². Batas deteksi biosensor terhadap empat pestisida organofosfat kurang dari 0,05 ppm.

Penelitian ini akan dikembangkan lebih lanjut yang meliputi :

- a. Mengembangkan teknik penyimpanan dan packaging OPH murni
- b. Mengembangkan teknik penyimpanan dan packaging elektroda kerja.
- c. Mengembangkan alat ukur hingga dapat menampilkan (readout) dalam satuan konsentrasi (ppm).

SUMMARY

An increased food demand is encourage increasind agriculture productiviry. So, the use of pesticides can no longer be avoided even tend to be excessive, which can cause food contamination in agricultural products. Department of Agriculture recommends for organophosphate pesticides because that is easily lost in nature. Nonetheless organophosphate pesticide residues in humans can cause both acute and chronic poisoning, it is caused by the accumulative nature of organophosphate pesticide residues. Therefore we need a device or method to determine pesticide residues in agricultural products, especially vegetables. In an effort to provide a method that is simple, inexpensive and can be done in the field, in this study will be made biosensors to detect levels of organophosphate pesticides. Biosensor is a tool that combines biological molecules with a transducer and a detector (electronic divise). This biosensor is made on the base on the hydrolysis reaction of organophosphates catalyzed by organophosphorus hydrolase. The reaction produces H^+ ion, that can enhance the conductivity of the solution, which is referred to as conductometric biosensors. Conductometric biosensors to detect levels of pesticide residues has been developed by a team of researchers, the biosensor made from platinum (Pt) coated by chitosan membrane. The biosensor has optimum performance at pH 9 with a range of concentrations 20-30 ppm with a sensitivity of 32 $\mu S/ppm$. This biosensor is less sensitive and can not reach the concentration range of 0.1 ppm as the maximum limits of pesticide residues . To increase the sensitivity of the study continued by used screen printed carbon electrode (SPCE) modified with Bovin Serum Albumin (BSA) - glutaraldehyde immobilization of organophosphorus hydrolase as a medium . Biosensors produce optimum performance at pH 8.5 by measuring response time 45 seconds. In optimum conditions the sensitivity of 28.04 $\mu S/ppm$ and a detection limit of 0.18 ppm and maximum pesticide concentrations that can be measured is 1ppm . Biosensors have been applied to measure pesticide residues in vegetable samples . Disadvantages of this biosensor is still inadequate detection limit (less than 0.1 ppm) . In this study there are three things that are developed with the involvement of three groups of researchers are:

- a. Iosolation and purification of organophosphate hydrolase (OPH) from *Pseudomonas putida*. Purification has been done by ammonium sulfate fracsination 0 – 45% and 45 – 65%, and continued by dialysis.
- b. Developing of electronic divice or conductometer
- c. Modification of Screen Printed Electrode (SPCE) by chitosan membrane. The research was developed surface area of electrode, 3; 5; and 7 mm^2 , and enzyme immobilization method is crosslink method. The organofosphate samples are diazinone, malation, chlorpyfos, and profenofos.

The results of research :

- a. The concentration of protein enzyme is 6444 ppm for isolated from 0-45% fractionation and 7856 ppm for isolated from 45-65% fractionation.
- b. Electronic divise has result signal at 200 – 4000 μS
- c. The area surface of electrode affecting to the signal, the optimum sensitivity resulted at 5 mm^2 surface area. Limmit of detection of biosensor to the organophosphate pesticides less than 0.05 ppm.

This study will be developed further include:

- a. Developing of storage and packaging techniques for pure OPH

- b. Developing of storage and packaging techniques for working electrode.
- c. Developing measurement tools to be able to display (readout) in units of concentration (ppm).

DAFTAR PUSTAKA

- Alegantina, S., Mariana Raini, Pudji Lastari, 2005, Penelitian Kandungan Organofosfat Dalam Tomat Dan Slada Yang Beredar Di Beberapa Jenis Pasar Di DKI, Departemen Kesehatan RI.
- Anonim, 1996, **Batas Maksimum Residu Pestisida Pada Hasil Pertanian**, Depkes dan Deptan, Jakarta
- Chaplin, M., 2004, **Potentiometric Biosensors**, Faculty of Engineering, Science and The Built Environment, South Bank University, London
- Choi, B. G., H.S. Park a, T. J. Park, D. H. Kim, S. Y. Lee, W. H. Hong, 2009, Development of the electrochemical biosensor for organophosphate chemicals using CNT/ionic liquid bucky gel electrode, *Electrochemistry Communications*, **11**, 672–675
- Chouteau, C., S.Dzyadevych, J.M.Chovelon dan C. Durrieu, 2004, **Development of Novel Conductometric Biosensors Based on Immobilized Whole Cell *Chlorella vulgaris* Microalgae**, *Biosensors and Bioelectronics*, **19**, 1089-1096
- Egins, B.R., 2002, **Chemical Sensors and Biosensors**, John Wiley & Sons, LTD, Singapore.
- Gan , N. , X. Yang , D. Xie , Y. Wu and W. Wen, 2010, A Disposable Organophosphorus Pesticides Enzyme Biosensor Based on Magnetic Composite Nano-Particles Modified Screen Printed Carbon Electrode, *Sensors*, **10**, 625 – 638
- Garcia, M.N.V., T. Mottram, 2003, **Biosensor Technology Addressing Agricultural Problems**. *Biosystems Engineering*, **84** ,1–12.
- Jaffrezic-Renault, N., 2001, New Trends in Biosensors for Organophosphorus Pesticides, *Sensors* , **1**, 60-74
- Jaffrezic-Renault, N. and Dzyadevych, S.V., 2008, Conductometric Microbiosensors for Environmental Monitoring, *Sensors*, **8**, 2569-2588.
- Knetl, A.C.L. dan L. Seng, 2003, Determination of Organophosphorus Pesticides in Vegetables by Solid-Phase Extraction Cleanup and Gas Chromatography, *Pertanika J. Sci. & Technol.* **11**, 93 - 105
- Mulyasuryani, A., Anna Roosdiana, Arie Srihardyastutie, dan Sutrisno, 2008, The

Development of Potentiometric Biosensor for Uric Acid Based on Uricase Immobilized on Chitosan Membrane, *The 2nd Penang International Conference For Young Chemists (Penang ICYC)*, Malaysia

Mulyasuryani, A., Roosdiana, A., Srihardyastutie, A., 2010, The Potentiometric Urea Biosensor using Chitosan Membrane, *Indo. J. Chem.*, **10**(2), 162 -166

Mulyasuryani, A. dan Arie Srihardyastutie, 2011, Conductometric Biosensor for the detection of Uric Acid by immobilization uricase on Nata de coco membrane-Pt electrode, *Anal. Chem. Insight*, **6**, 47 – 51

Pijanowska, D.G., dan W. Torbich, W., 2005, Biosensors for Bioanalytical Applications, *Bull. Pol. Ac. Tech.*, **53**(3), 251 0 260

Schulze, H., E. Scherbaum, M. Anastassiades, S.Vorlova, R.D.Schmid dan T.T.Bachmann, 2002, **Development, Validation, and Application of An Acetylcholinesterase-Biosensor Test for the Direct Detection of Insecticide Residues in Infant Food**, University of Stuttgart, Stuttgart

Shah, J., and Brown Jr, R. M., 2005, Towards Electronic Paper Displays made from Microbial Cellulose, *App.l Microbiol. Biotechnol* , **66**, 352–355

Simonian, A.L., A. W. Flounders, J. R. Wild, 2004, FET-Based Biosensors for The Direct Detection of Organophosphate Neurotoxins, *Electroanalysis*, **16**, 1896-1906

Wang, J., 2001, **Analytical Electrochemistry**, 2rd ed., VCH Publisher, Inc., 133 – 160.

Yu Lei , W. Chen, A. Mulchandani, 2008, Microbial biosensors, *Anal. Chim. Acta.*, **568**, 200-210

Yu Lei, P. Mulchandani 2, W. Chen 2 and A. Mulchandani, 2006, Biosensor for Direct Determination of Fenitrothion and EPN Using Recombinant *Pseudomonas putida* JS444 with Surface Expressed Organophosphorus Hydrolase. 1.

Modified Clark Oxygen Electrode, *Sensors*, **6**, 466-472