

PEMEGUNAN ENZIM UREASE DALAM BAHAN HIDROGEL METAKRILAT UNTUK MENGHASILKAN MEMBRAN BIOSENSOR UREA

KHOR SOOK MEI¹, LEE YOOK HENG^{2*} & MUSA AHMAD³

Abstrak. Bahan hidrogel metakrilat yang disediakan secara foto-pempolimeran telah dikaji sebagai satu matriks untuk pemegungan enzim urease. Tujuan utama penyediaan membran metakrilat untuk pemegungan enzim urease adalah untuk menilai sama ada membrane jenis ini boleh digunakan dalam reka bentuk biosensor urea. Sifat kehidrofilikan/kehidrofobikan hidrogel dimanipulasikan melalui komposisi monomer 2-hidroksil etil metakrilat (HEMA) dan metil metakrilat (MMA). Kajian pemegungan enzim yang telah dilakukan termasuk pemegungan urease secara foto-pempolimeran, kajian larut resap urease daripada membran dan penilaian ke atas sifat keaktifan enzim yang terpegun. Tiga jenis membran polimer telah dikaji, iaitu dua jenis membran yang disediakan secara foto-pempolimeran (fotoHEMA iaitu 100% HEMA dan MH28, nisbah MMA : HEMA = 2 : 8) dan juga polimer poli(2-hidroksietil metakrilat) (pHEMA) yang boleh didapati secara komersial dan digunakan sebagai perbandingan. Hasil kajian menunjukkan bahawa urease boleh dipegunkan dalam bahan hidrogel metakrilat secara foto-pempolimeran terus tanpa enzim dinyahaktifkan walaupun terdedah kepada cahaya ultra-lembayung. Penggunaan komposisi MMA : HEMA dan proses penyediaan membran secara foto-pempolimeran dapat menghasilkan sifat kehidrofilikan/kehidrofobikan bahan membran hidrogel yang dikehendaki dan seterusnya kelarutresapan enzim juga dikurangkan berbanding membran daripada pHEMA komersial. Bahan hidrogel metakrilat foto-polimer yang paling sesuai sebagai matriks pemegungan enzim urease untuk tujuan kegunaan biosensor urea ialah hidrogel MH28 yang mempunyai peratus serapan air < 8% dalam masa sejam. Bahan ini juga didapati boleh memberikan keaktifan enzim terpegun yang lebih tinggi berbanding dengan bahan hidrogel lain yang dikaji. Kajian ini telah menunjukkan bahawa kaedah mudah seperti proses foto-pempolimeran boleh digunakan dalam penyediaan membran untuk sesuatu biosensor dan ia dapat menangani masalah kehilangan enzim dari pada membran biosensor yang nipis.

Kata kunci: Bahan hidrogel metakrilat; foto-pempolimeran; serapan air; hidrofilik; hidrofobik; enzim; larut resap

Abstract. Methacrylate hydrogel materials prepared by photopolymerisation were used as matrices for urease enzyme immobilization for the purpose of assessing their possible application as biosensor membranes for urea. The hydrophilic/hydrophobic properties of the hydrogel were manipulated by changing the composition of the monomers 2-hydroxyl ethyl methacrylate (HEMA) and methyl methacrylate (MMA). Studies on enzyme immobilization included immobilization by photocuring, enzyme leaching and activity evaluation. Three types of polymeric membranes were studied, i.e. two of them were prepared by photocuring (fotoHEMA, i.e. 100% HEMA and MH28 with MMA :

^{1, 2 & 3} Pusat Pengajian Sains Kimia & Teknologi Makanan, Fakulti Sains & Teknologi, Universiti Kebangsaan Malaysia, 43000 Bangi, Selangor Darul Ehsan, Malaysia

*Corresponding author to Lee Yook Heng, Email: yhl1000@pkrisc.cc.ukm.my

HEMA ratio = 2 : 8) and polymer poly(2-hydroxyethyl methacrylate) (pHEMA), which can be obtained commercially and used for comparison purposes. The results indicated that urease was not deactivated even exposed to ultra-violet light during photopolymerisation. The use of the MMA : HEMA composition and photocuring process is able to produce membrane of the desired hydrophilicity/hydrophobicity and reduced the leaching of the enzyme compared with commercially available pHEMA. The most suitable methacrylate hydrogel material for urease immobilization for biosensor membrane was polymer MH28 that had water absorption < 8% within an hour. This hydrogel material was also observed to retain higher activity for the immobilized urease when compared with the other hydrogel materials investigated. This work has demonstrated that a simple method such as photocuring can be used in the fabrication of a biosensor membrane and the problem of enzyme leaching can be prevented from a thin biosensor membrane.

Keyword: Methacrylic hydrogel materials; photo-polymerisation; water absorption; hydrophilic; hydrophobic; enzyme; leaching

1.0 PENGENALAN

Pemegunan enzim secara pemerangkapan dalam gel merupakan cara yang paling popular dalam pemegunan biomangkin untuk tujuan pembangunan biosensor. Bahan polimer asli seperti gelatin, agaros, carrageenan, selulosa dan albumin merupakan bahan yang sering digunakan untuk tujuan pemegunan enzim pada mulanya [1, 2]. Malangnya semua bahan ini mempunyai sifat mekanikal yang lemah, toleransi suhu yang rendah dan tiada rintangan terhadap serangan mikrobial [3]. Sebagai alternatif, enzim boleh dipegunkan dengan menggunakan bahan polimer jenis sintetik. Antara bahan polimer yang sering digunakan ialah poli(2-hidroksil etil metakrilat) (pHEMA) disebabkan bahan matriks ini mempunyai kebioserasian yang baik, bersifat hidrofilik dan mempunyai kekuatan mekanikal [3]. Sifat kehidrofilikan adalah penting untuk memegang enzim yang dipegunkan di samping membolehkan pergerakan ion dan substrat yang bebas dalam membran tersebut [4].

Proses pemegunan enzim dalam hidrogel pHEMA membenarkan aktiviti enzim terpegun itu dikekalkan, pengawalan sifat ketelapan yang baik demi memastikan keberkesanan pemindahan jisim (reaktan dan hasil) yang berkesan dan mempunyai rintangan terhadap kimia yang baik. Enzim juga terlindung daripada degradasi oleh bakteria kerana bakteria dan enzim proteolitik tidak boleh memasuki matriks penyokong gel [3].

Satu contoh penggunaan polimer sebagai bahan membran ialah biopenderia urea. Urea merupakan hasil utama daripada tindak balas pencernaan protein dalam badan manusia. Kandungan urea dalam serum darah manusia bergantung kepada metabolisme dan pengambilan protein. Ini dikawal oleh perkumuhan ginjal. Kepekatan urea dalam serum darah manusia adalah sekitar 1.7 – 8.3 mmol/L [5]. Dengan demikian, kepekatan urea dalam serum mencerminkan sistem perkumuhan buah pinggang [6]. Untuk penentuan urea, biosensor yang berasaskan enzim urease boleh digunakan. Pembinaan biosensor urea berdasarkan hidrolisis urea oleh urease (EC 3.5.1.5):



Tindak balas (1) membebaskan ammonia dan karbon dioksida yang membentuk ion ammonium dan bikarbonat masing-masing. Oleh itu, penentuan kepekatan urea dengan kaedah biosensor boleh dilakukan secara tidak langsung dengan penentuan ion NH_4^+ atau ion H^+ yang dibebaskan. Kepekatan urea boleh ditentukan dengan biosensor urea jenis potentiometrik yang menggunakan elektrod yang mempunyai membran berlapis, iaitu membran enzim (membran atas) dan membran ionofor (membran transduser/membran bawah) [7].

Jenis membran yang sering digunakan dalam pemegunan urease untuk pembinaan biosensor potentiometrik untuk urea ialah jenis sol-gel [8, 9], polivil alkohol [10], chitosan [11] dan poli(karbamoilsulfonat) [12]. Dalam kajian ini, bahan polimer jenis hidrogel metakrilat yang boleh disediakan secara foto-pempolimeran dengan sifat kehidrofilikan yang berbeza telah digunakan sebagai matriks dalam pemegunan enzim urease. Kebaikan penggunaan hidrogel jenis metakrilat ialah membrannya boleh disediakan secara foto-pempolimeran dan sifat kehidrofilikan membran boleh dikawal untuk mengelakkan larut lesap enzim urease. Di samping itu, penggunaan kaedah foto-pempolimeran juga membolehkan biosensor difabrikasikan dengan cara fotolitografi untuk menghasilkan biosensor secara besar-besaran dan cepat. Sifat kesesuaian membran polimer metakrilat untuk pemegunan urease dalam kajian ini diteliti melalui uji kaji serapan air, kelarutresapan dan keaktifan enzim.

2.0 BAHAN DAN KAEDAH

2.1 Reagen

Bahan-bahan kimia yang digunakan dalam kajian ini adalah seperti berikut: Enzim urease (EC 3.5.1.5) 54300 unit/mg pepejal, urea (99.9%) (Merck), bovin serum albumin (2 mg BSA/mL, Sigma), reagen Bradford (Sigma), larutan penimbal TrisHCl (Aldrich), polimer poli(2-hidroksil etil metakrilat) (pHEMA) (Sigma), monomer 2-hidroksil etil metakrilat (HEMA)(Aldrich), monomer metil metakrilat (MMA) (Aldrich), 2,2-dimetoksi-2-fenilasetofenon (DMPP) (99%, Aldrich), ammonium klorida, 1,4-dioksan, mangan(II) sulfat ($\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$), natrium hipoklorit (NaOCl) dan fenol (Aldrich).

Semua bahan kimia yang digunakan dalam kajian ini adalah gred analisis serta digunakan terus tanpa penulenan lanjut. Air suling yang digunakan untuk penyediaan semua larutan dalam uji kaji ini adalah air suling ternyahion (Water Deioniser UHQ, Elga). Urease dan urea digunakan secara terus. Reagen Bradford telah dicairkan ke nisbah 1 : 5 dengan air nyahion. Larutan penimbal TrisHCl digunakan sebagai elektrolit penyokong. Semua larutan akueus disediakan dengan menggunakan air suling ternyahion.

2.2 Tatakaedah

Sebanyak dua jenis polimer metakrilat yang berlainan sifat fizikal telah disediakan untuk tujuan kajian membran biopenderia. Polimer ini ialah foto-polimer poli(2-hidroksil etil metakrilat) (fotoHEMA) dan ko-polimer yang mengandungi dua jenis monomer, iaitu foto-kopolimer poli(2-hidroksil etil metakrilat-ko-metil metakrilat) (MH28) dengan nisbah monomer MMA : monomer HEMA ialah 2 : 8.

2.3 Penyediaan Bahan Polimer untuk Membran

Cara penyediaan bahan polimer adalah seperti yang pernah dilaporkan [13 – 16]. Untuk polimer fotoHEMA, satu campuran disediakan dengan mencampur 1 g monomer HEMA dan bahan pemula DMPP sebanyak 1.6%. Untuk kopolimer poli(2-hidroksil etil metakrilat-ko-metil metakrilat) (MH28), nisbah monomer MMA kepada monomer HEMA ialah 2 : 8 mengikut berat dan bahan pemula DMPP ialah sebanyak 1.6% mengikut berat. Selepas itu, campuran ini didedahkan kepada pancaran cahaya ultralembayung dalam satu unit pendedahan ultralembayung (RS Co.) yang mempunyai empat tiub ultralembayung (setiap tiub 15 W) dengan pancaran pada panjang gelombang 350 nm. Tempoh pendedahan untuk pembentukan polimer ialah selama 5 minit. Dalam tempoh ini, polimer keras dan lut sinar akan terbentuk. Untuk penyediaan polimer yang terpegun enzim urease, larutan monomer dan bahan pemula dicampur bersama larutan enzim yang kepekataannya 1 mg/mL dengan nisbah 1 : 1 (v/v) sebelum proses fotopempolimeran diadakan.

Membran polimer terdiri daripada pHEMA komersial disediakan dengan melarutkan sebanyak 80 mg polimer pHEMA dalam 800 mL air nyahion dan 200 mL 1,4-dioksan. Kuantiti larutan polimer pHEMA tertentu kemudian dibiarkan kering pada suhu bilik selama semalaman sehingga satu membran nipis dan lut sinar terbentuk. Untuk penyediaan polimer terpegun enzim, larutan polimer pHEMA dicampur bersama larutan enzim urease yang kepekataannya 1 mg/mL dengan nisbah 1 : 1 (v/v).

2.4 Kajian Serapan Air Polimer Metakrilat

Membran polimer blank (tanpa enzim) atau terpegun enzim urease yang berat dan saiz tetap disediakan. Selepas itu, semua membran direndamkan dalam larutan penimbal fosfat 0.1 M. Setelah lima minit dalam penimbal, jumlah berat polimer dicatatkan. Berat sebenar air yang telah diserap masuk ke dalam polimer metakrilat tersebut selepas masa lima minit perendaman ditentukan. Serapan air ke dalam membran polimer metakrilat telah dikaji dan ditentukan untuk selang masa lima minit untuk tempoh selama satu jam. Kajian serapan air membran metakrilat yang terpegun enzim turut dikaji untuk melihat kesan kehadiran enzim dan pengaruhnya terhadap kadar kemasukan air ke dalam membran polimer.

2.5 Kajian Larut Lesap Enzim

Membran polimer yang terpegun enzim urease direndam dalam larutan penimbal fosfat 0.1 M, pH 6.7. Selepas 5 minit, sebanyak 1 mL larutan penimbal fosfat tersebut dipipet keluar serta setiap alikuot dicampur bersama 10 μL reagen Bradford yang telah dicairkan dalam nisbah 1 : 5 untuk membentuk satu larutan berwarna biru muda. Serapan warna itu diukur menggunakan alat spektroskopi UL-nampak Varian Cary-100 untuk mengesan kehadiran enzim secara kuantitatif, iaitu enzim yang terlarut lesap keluar dari membran polimer metakrilat ke dalam larutan penimbal fosfat. Langkah ini diulang setiap 5 minit sehingga tempoh masa satu jam.

Untuk penentuan kepekatan sebenar enzim yang terlarut lesap, satu graf kalibrasi piawai disediakan. Larutan protein piawai (albumin serum bovin, BSA) dengan isi padu 0 μL , 10 μL , 30 μL , 50 μL dan 70 μL dicampurkan masing-masing dengan 1.2 mL tris-HCl dan 10 μL reagen Bradford (pencairan 1 : 5). Perubahan warna diukur menggunakan alat spektrofotometer pada panjang gelombang 595 nm. Graf kalibrasi piawai diperolehi dengan memplotkan serapan melawan kepekatan BSA. Hubungan antara sifat serapan air oleh polimer hidrogel metakrilat dan sifat larut lesap enzim juga ditentukan melalui lengkung kalibrasi ini.

2.6 Kajian Aktiviti Enzim Urease

Aktiviti enzim urease terpegun ditentukan secara mengukur ion ammonium yang dibebaskan apabila enzim memangkinkan tindak balas hidrolisis urea dalam larutan penimbal TrisHCl pada pH 7. Ion ammonium ditentukan dengan kaedah fenat [17]. Reagen asid hipoklorus disediakan dengan penambahan 10 mL 5% larutan NaOCl (bahan peluntur) kepada 40 mL air. Penyelarasan pH dilakukan sehingga pH 6.5 – 7.0 dengan menggunakan asid HCl. Larutan manganat sulfat (MnSO_4) 0.006 N disediakan. Untuk penyediaan reagen fenat, 2.5 g NaOH dan 10 g fenol dilarutkan dalam 100 mL air. Larutan stok ammonium disediakan dengan melarutkan NH_4Cl dalam air dan larutan dicairkan sehingga 1000 mL. Larutan piawai ammonium pula disediakan dengan mencairkan 5 mL larutan stok ammonium kepada 1000 mL dengan air bebas ammonia.

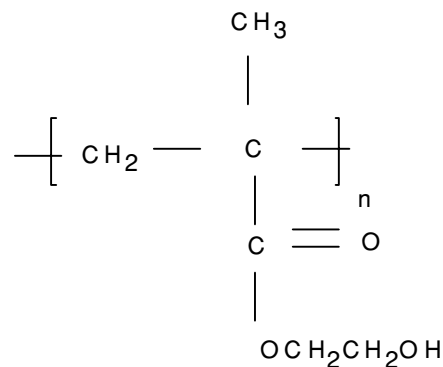
Langkah penentuan kepekatan ammonium dalam larutan piawai/sampel menggunakan kaedah fenat adalah seperti berikut: Satu titis (~ 0.05 mL) larutan MnSO_4 ditambahkan ke dalam 10.0 mL larutan sampel. 0.5 mL reagen asid hipoklorus ditambahkan dan dengan segera, titis demi titis, 0.6 mL reagen fenat ditambah. Pembentukan warna lengkap dalam masa 10 minit. Pengukuran serapan dilakukan pada panjang gelombang 600 nm [17]. Graf kalibrasi NH_4^+ dalam julat kepekatan 0.10 sehingga 1.00 $\mu\text{g/mL}$ disediakan dengan kaedah fenat.

3.0 HASIL DAN PERBINCANGAN

Sifat serapan sesuatu bahan boleh dicirikan dengan mengukur kandungan air keseimbangan (EWC). Ia boleh dikira seperti dalam Persamaan 2.1. dan menggambarkan sifat keunikan sesuatu polimer hidrogel dalam penyerapan air [18].

$$EWC = \frac{\text{berat air terkandung di dalam gel}}{\text{jumlah berat gel terhidrat}} \times 100 \% \quad \dots 2.1$$

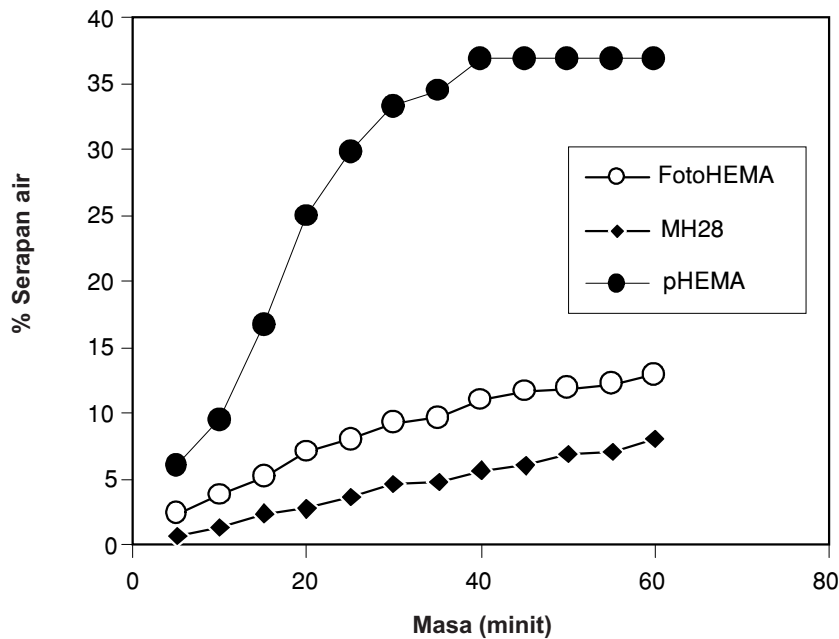
Secara umum, polymer jenis hidrogel metakrilat mempunyai banyak kumpulan hidroksil (Rajah 1). Kehadiran kumpulan berfungsi $-OH$ pada rantai sisi unit ulangan boleh menyebabkan sesuatu monomer atau polimer bersifat polar dan hidrofilik. Ini membolehkan polimer ini berinteraksi dengan air secara pembentukan ikatan hidrogen dan memberikan sifat hidrofilik. Polimer yang hidrofilik akan membolehkan molekul yang terlarut di dalam larutan akueus seperti substrat enzim mudah menembusnya supaya bertindak balas dengan biomolekul yang terpegun dalam membran polimer.



Rajah 1 Struktur polimer hidrogel metakrilat (pHEMA)

3.1 Sifat Penyerapan Air untuk Membran Polimer Tanpa Enzim

Perbandingan serapan air antara polimer hidrogel metakrilat jenis pHEMA, fotoHEMA dan foto-kopolimer MH28 ditunjukkan dalam Rajah 2. Polimer fotoHEMA dan MH28 yang disediakan secara foto-pempolimeran didapati menyerap air lebih perlahan berbanding dengan pHEMA komersial yang dapat mencapai EWC dengan lebih cepat di samping menyerap kuantiti air yang lebih tinggi. Peratus serapan air oleh pHEMA ialah 36.90%, untuk foto-polimer fotoHEMA 12.99% dan untuk MH28 8.08% dalam tempoh masa satu jam. Kepentingan pengangkutan air melalui pelbagai membran hidrogel seperti pHEMA pernah dikaji [19, 20] dan Moradi *et al.*, [21] telah melaporkan bahawa kandungan air keseimbangan, EWC pHEMA adalah sekitar 40% apabila ia didedahkan kepada air selama 5 hari. Ini adalah hampir sama dengan amaun air yang diserap oleh membran pHEMA dalam kajian ini (Rajah 2).

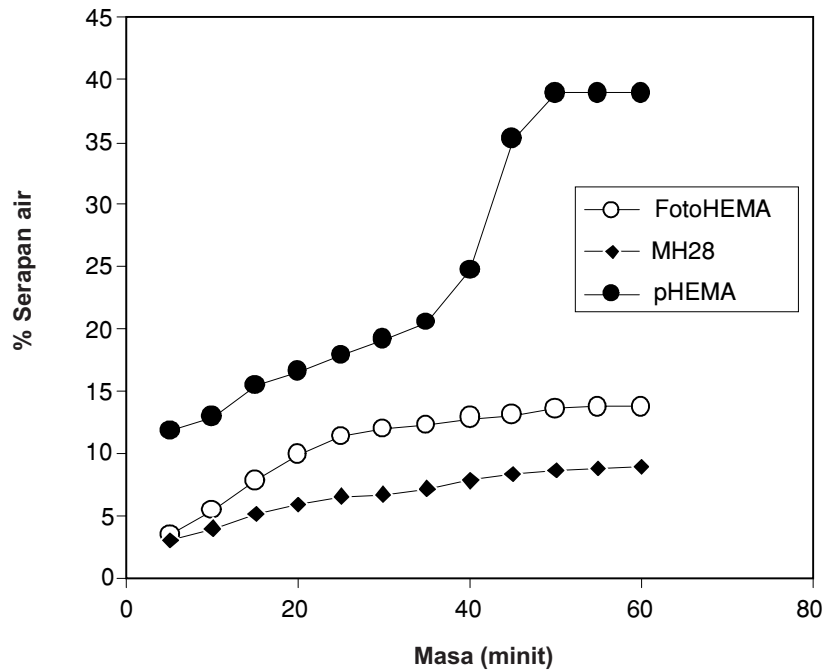


Rajah 2 Peratus serapan air polimer hidrogel metakrilat tanpa enzim terpegun (Setiap data adalah duplikat, $n = 2$)

Sungguhpun pHEMA dan fotoHEMA mempunyai 100% monomer HEMA dan harus menunjukkan sifat kehidrofilikan yang sama tetapi peratus serapan air fotoHEMA adalah rendah berbanding pHEMA komersial kerana teknik penyediaan yang berbeza. Ia itu pHEMA disediakan secara pempolimeran secara emulsi [22], manakala fotoHEMA secara foto-pempolimeran pukal. Ini menunjukkan bahawa kehidrofilikan sesuatu membran polimer boleh diubahsuai dengan memilih kaedah penyediaan yang berbeza walaupun komposisi kimia polimer itu serupa. Foto-pempolimeran pukal untuk HEMA menyebabkan polimer itu lebih tumpat dan juga terhasil ikatan taut-silang. Kebolehan penyerapan air yang rendah untuk fotopolimer adalah disebabkan oleh kehadiran rantai taut-silang dalam polimer fotoHEMA. MMA dalam foto-kopolimer MH28 adalah sejenis monomer yang bersifat lebih hidrofobik (tidak mempunyai kumpulan $-OH$). Kehadiran MMA dalam MH28 menjadikan foto-kopolimer MH28 lebih hidrofobik berbanding fotoHEMA. Selain itu, penggunaan metil metakrilat adalah untuk meningkatkan kekuatan mekanikal ko-polimer MH28 [13].

3.2 Sifat Penyerapan Air untuk Membran Polimer Terpegun Enzim

Pemegunan urease ke dalam polimer hidrogel metakrilat secara pemerangkapan fizikal dan kesannya terhadap sifat serapan air polimer ditunjukkan dalam Rajah 3. Didapati



Rajah 3 Peratus serapan air polimer hidrogel metakrilat yang terpegun enzim urease (0.1 mg urease terpegun untuk setiap membran). (Setiap data adalah duplikat, $n = 2$)

pemegunan enzim dalam polimer hidrogel metakrilat memberikan trend penyerapan air yang sama, iaitu penyerapan air adalah paling tinggi pada pHEMA diikuti oleh fotoHEMA dan MH28.

Seperti dalam Jadual 1, peratus serapan air oleh pHEMA terpegun urease (38.89%) adalah lebih tinggi ($\alpha = 0.05$) berbanding dengan pHEMA tanpa enzim terpegun (36.90%). Pernah dilaporkan bahawa serapan air oleh membran hidrofilik jenis poliuretana dipengaruhi oleh jumlah kuantiti urease yang terpegun [4]. Sifat pHEMA sebagai hidrogel yang banyak menyerap air menyebabkan peningkatan pemindahan

Jadual 1 Perbandingan peratus serapan air dalam polimer hidrogel metakrilat yang terpegun dan tanpa terpegun urease

| | Peratus Serapan Air (%) | |
|---------|----------------------------|-------------------------------|
| | Tanpa enzim ($n = 3$) | Terpegun enzim ($n = 3$) |
| pHEMA | **36.90 \pm 0.87 | 38.89 \pm 0.05 |
| FotoHEA | 12.99 \pm 0.46 | 13.78 \pm 0.28 |
| MH28 | 8.08 \pm 0.68 | 8.97 \pm 0.15 |

** Perbezaan bererti pada paras $\alpha = 0.05$

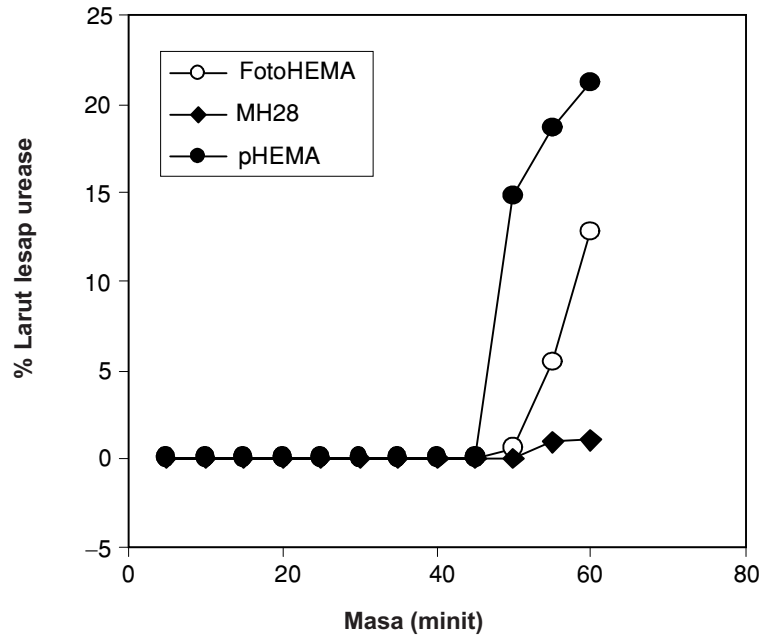
jisim dan kebebasan pergerakan biomolekul keluar masuk melalui membran polimer. Kehadiran enzim terus memberikan kesan ke atas penyerapan air. Keadaan ini harus dikawal jika polimer tersebut ingin digunakan sebagai matriks pemegunan enzim dalam pembinaan biopenderia. Walaupun demikian, ujian-t menunjukkan bahawa pasangan data penyerapan air untuk polimer yang disediakan secara foto-pempolimeran (fotoHEMA dan MH28) menunjukkan tidak ada perbezaan antara penyerapan air untuk polimer yang tanpa dan dengan kehadiran enzim terpegun. Pada keadaan yang lebih hidrofobik, urease terpegun didapati tidak banyak mempengaruhi sifat penyerapan air kerana pemindahan jisim dalam matriks polimer jenis ini dijangka terhad.

3.3 Sifat Larut Lesap Enzim daripada Membran Hidrogel Metakrilat

Syarat penting dalam penghasilan biopenderia berasaskan enzim yang baik bukan sekadar dinilai dari segi rangsangan yang tepat dan cepat, malah sifat kestabilan, kebolehasilan dan kebolehulangan biosensor dalam analisis juga harus dititikberatkan. Satu cara untuk mencapai ini adalah dengan mengelakkan masalah larut lesap enzim. Teknik biasa untuk mengatasi masalah larut lesap enzim adalah dengan menambahkan agen taut-silang seperti glutaraldehid semasa proses penyediaan polimer [23]. Walau bagaimanapun, teknik ini dianggap rumit dan melibatkan beberapa langkah tambahan dalam penyediaan membran biosensor. Tindak balas pengikatan enzim semasa pemegunan juga boleh menyahaktifkannya. Oleh itu pemegunan enzim dalam satu matriks yang mempunyai kehidrofilikan/kehidrofobikan yang sesuai secara pemerangkapan fizikal untuk mengelakkan larut lesap enzim adalah lebih mudah dan sesuai.

Rajah 4 menunjukkan perbandingan peratus larut lesap urease dari polimer hidrogel metakrilat. Untuk jenis polimer pHEMA dan fotoHEMA, kelarutlesapan urease mula dicerap hanya selepas minit ke-40 sementara tidak ada larut lesap urease dicerap untuk membran MH28. Ini adalah berkaitan dengan sifat polimer pHEMA yang lebih hidrofilik berbanding dengan MH28. Walau bagaimanapun, peratus larut lesap enzim dari fotoHEMA lebih rendah berbanding pHEMA. Urease merupakan jenis enzim yang mudah larut dalam larutan akueus dan mempunyai berat molekul yang tinggi (480,000 Dalton) [24]. Biasanya penjerapan protein (contohnya enzim) pada permukaan hidrofobik (seperti MH28) adalah lebih tinggi berbanding penjerapan protein pada permukaan hidrofilik (seperti pHEMA) kerana kewujudan interaksi hidrofobik antara protein dengan membran polimer [25]. Ini boleh menyebabkan kehilangan enzim.

Sifat kehidrofobikan monomer MMA dalam foto-kopolimer MH28 mengurangkan kebolehan penyerapan air dalam polimer MH28. Sifat separa hidrofobik MH28 hanya membenarkan molekul analit yang bersaiz kecil bergerak masuk polimer tetapi tidak membenarkan enzim yang bersaiz molekul besar dari pada terlarut lesap keluar. Oleh



Rajah 4 Peratus larut lesap urease daripada polimer jenis metakrilat (1 mg urease terpegun untuk setiap membran. Setiap data adalah duplikat, $n = 2$)

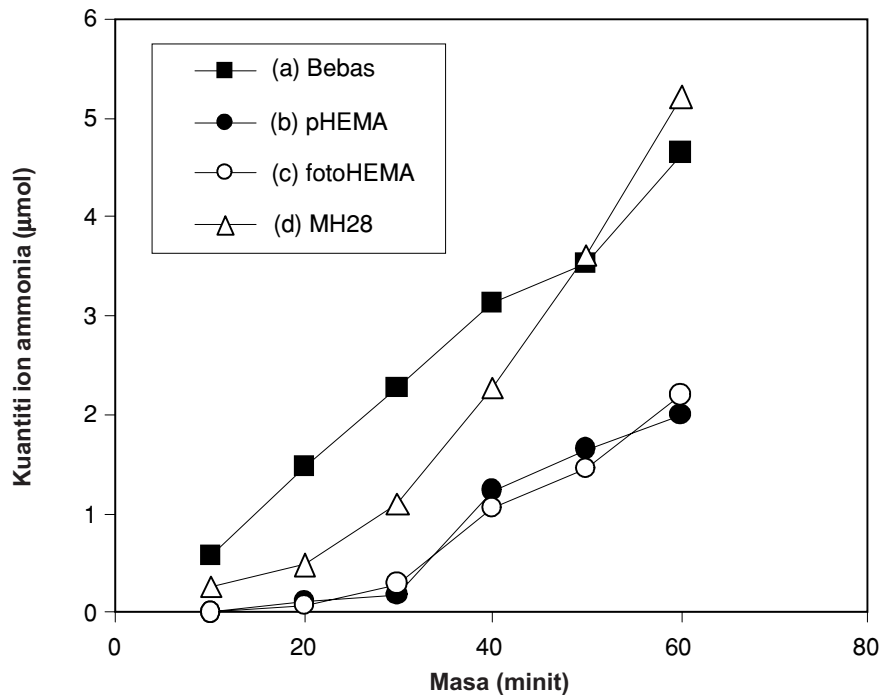
itu, enzim yang terpegun dalam MH28 hanya boleh mengalami tindak balas dalam polimer yang enzim dipegunkan. Tambahan lagi, kumpulan metil dalam MH28 yang bersifat hidrofobik membenarkan membran polimer melekat dengan baik pada permukaan transduser dan masalah peretakan membran boleh diatasi kerana ia sukar tertanggal dari permukaan elektrod [26]. Proses larut lesap urease dari ketiga-tiga polimer hidrogel metakrilat hanya bermula selepas minit ke-40. Oleh itu, semua polimer ini sesuai digunakan dalam pembinaan biosensor kerana masa rangsangan biosensor biasanya pantas dalam beberapa minit sahaja.

3.4 Sifat Keaktifan Enzim Terpegun dalam Hidrogel Metakrilat

Keaktifan enzim seharusnya tinggi walaupun terpegun dalam membran polimer supaya menghasilkan rangsangan biosensor yang berfungsi. Enzim yang aktivitinya rendah atau sudah ternyahasli melambatkan kadar tindak balas dan rangsangan biosensor kurang memuaskan. Tujuan pemegungan enzim adalah untuk melindungi sifat semula jadi enzim daripada diubahsuai kerana pendedahan kepada faktor-faktor luaran seperti perubahan pH yang keterlaluan. Contohnya tindak balas pemangkinan urea oleh enzim urease menghasilkan ion hidroksida boleh meningkatkan pH larutan sehingga $\text{pH} > 8$. Pada julat pH ini keaktifan enzim boleh menurun [27, 28].

Penentuan keaktifan enzim urease dilakukan dengan mengukur ion ammonium yang dihasilkan secara kaedah fenat [17]. Graf kalibrasi yang diperolehi untuk kaedah fenat dalam penentuan paras ion ammonium secara kuantitatif adalah linear antara kepekatan ammonium 0.10 – 1.00 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ($R^2 = 0.9882$, $y = 0.1994x + 0.0308$). Semua kajian keaktifan urease terpegun terlibat pengiraan kecerunan lengkung keaktifan pada julat linear. Nilai ini dibandingkan dengan keaktifan enzim dalam larutan bebas sebagai rujukan. Perubahan keaktifan enzim terpegun dalam setiap membran polimer terhadap masa serta berbanding dengan enzim bebas dalam larutan ditunjukkan dalam Rajah 5. Pada amnya kedua-dua pHEMA dan fotoHEMA menunjukkan keaktifan yang paling rendah di sepanjang tempoh kajian. Untuk foto-kopolimer MH28, keaktifannya meningkat perlahan-lahan sehingga melebihi enzim bebas pada tempoh akhir kajian.

Kejadian ini boleh diterangkan dengan sifat penyerapan air membran MH28 yang perlahan dan juga sifat kehidrofobikan yang lebih tinggi dapat menghalang kelarutresapan enzim di samping melindunginya daripada pelbagai faktor yang boleh menyebabkan penyahaktifan enzim apabila tindak balas diadakan berpanjangan. Enzim dalam keadaan terpegun adalah terlindung dan lebih stabil berbanding enzim bebas dalam larutan kerana enzim yang terpegun tidak mudah dinyahasikan oleh



Rajah 5 Perbandingan keaktifan enzim urease dalam keadaan larutan bebas dan keadaan terpegun: (a) enzim dalam larutan bebas, (b) enzim terpegun dalam pHEMA, (c) enzim terpegun dalam fotoHEMA dan (d) enzim terpegun dalam MH28 (Setiap data adalah tripliket, $n = 3$, lihat Jadual 2).

Jadual 2 Sifat aktiviti enzim urease yang bebas dan terpegun dalam beberapa jenis membran polimer metakrilat yang diukur oleh pembebasan ammonia daripada substrat urea ($n = 3$)

| Masa (minit) | Urease Bebas | Ammonia dibebaskan Urease terpegun pHEMA | (μmol) Urease terpegun fotoHEMA | Urease terpegun MH28 |
|--------------|-----------------|--|--|----------------------|
| 10 | 0.58 \pm 1.17 | 0 | 0 | 0.27 \pm 0.60 |
| 20 | 1.47 \pm 1.04 | 0.10 \pm 0.38 | 0.06 \pm 0.46 | 0.49 \pm 0.32 |
| 30 | 2.26 \pm 1.09 | 0.18 \pm 0.39 | 0.29 \pm 0.42 | 1.09 \pm 0.93 |
| 40 | 3.12 \pm 1.10 | 1.22 \pm 0.71 | 1.06 \pm 0.40 | 2.27 \pm 0.95 |
| 50 | 3.52 \pm 1.36 | 1.65 \pm 0.85 | 1.45 \pm 0.24 | 3.61 \pm 1.79 |
| 60 | 4.63 \pm 1.19 | 2.00 \pm 0.92 | 2.20 \pm 0.66 | 5.20 \pm 1.38 |

perubahan luar seperti perubahan pH atau perubahan suhu yang berlaku secara mendadak seperti dalam medium biologi [29]. Selain itu, enzim yang terpegun juga berupaya memindahkan nilai optimum pH kepada nilai yang lebih tinggi berbanding nilai optimum pH untuk enzim bebas kerana pengumpulan ion H^+ boleh berlaku dalam membran polimer [30]. Oleh itu, polimer MH28 merupakan matriks yang paling baik untuk pemegunan enzim urease berbanding pHEMA atau fotoHEMA yang mengalami larut lesap enzim yang lebih tinggi.

4.0 KESIMPULAN

Kajian ini telah menunjukkan bahawa pemegunan enzim dalam bahan hidrogel metakrilat boleh dilakukan secara foto-pempolimeran terus tanpa menyahaktifkan enzim oleh cahaya ultra-lembayung. Ini memberikan satu cara yang mudah dalam penyediaan membran untuk sesuatu biosensor berbanding dengan kaedah sintesis bahan hidrogel pHEMA yang pernah dilaporkan [22]. Penggunaan kaedah foto-pempolimeran untuk penyediaan membran yang terpegun enzim adalah serasi dengan proses penghasilan biosensor secara mikrofabrikasi melalui fotolitografi yang banyak menggunakan cahaya ultra-lembayung. Bahan hidrogel metakrilat yang didapati paling sesuai sebagai matriks pemegunan enzim urease untuk tujuan kegunaan biosensor urea ialah hidrogel yang mengandungi HEMA dan MMA dengan peratus serapan air yang kurang daripada 8% dalam masa sejam. Bahan ini didapati memberikan sifat larut lesap urease yang paling rendah dan juga boleh mengekalkan keaktifan enzim terpegun lebih tinggi (3 kali ganda) berbanding dengan bahan hidrogel lain yang dikaji. Semua faktor ini boleh menyumbang kepada satu biosensor urea yang baik.

PENGHARGAAN

Penghargaan dituju kepada MOSTI yang telah menaja penyelidikan ini melalui geran Top Down 09-03-03-0006BIOTEK dan geran IRPA 09-02-02-0002-EA057.

RUJUKAN

- [1] Scardi, V., M. Cantarella, L. Gianfreda, R. Palessandolo, F. Alfani, and G. Greco. 1980. Enzyme Immobilization by Means of Ultrafiltration Techniques. *Biochimie*. 162: 635 – 643.
- [2] Turkova, J., D. Hubslkova, M. Krivakova, and J. Coupek, 1973. Affinity Chromatography on Hydroalkyl-methacrylate Gels: Preparation of Immobilized Chymotrypsin and Its Use In the Isolation of Proteolytic Inhibitors. *Biochem. Biophys. Acta*. 322: 161 – 172.
- [3] Bickerstaff, G. F. 1997. *Immobilization of Enzymes and Cells. Methods in Biotechnology*. Totowa, New Jersey: Humana Press.
- [4] Jae, H. S., Y. Y. Sang, J. Y., Sung, H. C., Sung, D. L., N. Hakhyun, and S. C. Geun. 1998. Potentiometric Biosensors Using Immobilized Enzyme Layers Mixed With Hydrophilic Polyurethane. *Sensors and Actuators B*. 50: 19 – 26.
- [5] Rick, W. 1990. *Klinische Chemie und Mikroskopie*. New York: Springer-Verlag.
- [6] Bertocchi, P., and D. Compagnone. 1996. Amperometric Ammonium Ion and Urea Determination with Enzyme-based Probes. *Biosensors Bioelectron*. 11: 1 – 10.
- [7] Watson, A. M., and J. Keyes. 1976. A Specific Urea Electrode. *J. Am. Chem. Soc.* 104: 2164 – 2165.
- [8] Pandey, P. C., and A. P. Mishra. 2004. Novel Potentiometric Sensing of Creatinine. *Sensors Actuators B*. 99: 230 – 235.
- [9] Pandey, P. C., and G. Singh. 2001. Tetraphenylborate Doped Polyaniline Based Novel pH Sensor and Solid-state Urea Biosensor. *Talanta*. 55: 773 – 782.
- [10] Wang, J. Q., J. C. Chou, T. P. Sun, S.K. Hsiung, and G.B. Hsiung. 2003. pH-based Potentiometric Flow Injection Biosensor for Urea. *Sensors Actuators B*. 91: 5 – 10.
- [11] Magalhaes, J. M. C. S., and A. A. S. C. Machado. 1998. Urea Potentiometric Biosensor Based on Urease Immobilized on Chitosan Membranes. *Talanta*. 4: 183 – 191.
- [12] Eggenstein, C., M. Borchardt, C. Diekmann, B. Grundig, C. Dumschat, K. Cammann, M. Knoll, and F. Spencer. 1999. A Disposable Biosensor for Urea Determination in Blood Based on An Ammonium-sensitive Transducer. *Biosensors & Bioelectronics*. 14: 33 – 41.
- [13] Heng, L. Y., and E. A. H. Hall. 2000. Producing “Self-plasticizing” Ion-selective Membranes. *Anal. Chem.* 72(1): 42 – 51.
- [14] Heng, L. Y., and E. A. H. Hall. 2001. Assessing of Photocured Self-plasticised Acrylic Membrane Recipe for Na⁺ and K⁺ Ion-selective Electrodes. *Anal. Chim. Acta*. 443(1): 25 – 40.
- [15] Heng, L. Y., H. C. Loh, and M. Ahmad. 2002. A Hydrogen Ion-selective Sensor Based on Non-plasticised Methacrylic-acrylic Membranes. *Sensors*. 2: 339 – 346.
- [16] Heng, L. Y., A. Sagir, and M. Ahmad. 2004. Ammonium Ion Sensor Based on Photocured and Self-plasticising Acrylic Films for the Analysis of Sewage. *Sensors & Actuators B*. 98: 160 – 165.
- [17] APHA. 1992. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, American Public Health Association. Washington D.C.
- [18] Bronzino, J. 2000. *The Biomedical Engineering Hand Book*. Vol. 1, 2nd ed., Publisher CRC, Boca Raton, FL.
- [19] Allan, S. H. 2002. Hydrogel for Biomedical Applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 43: 3 – 12.
- [20] Gavin, H., C. Anuj, and C. J. Radke. 2003. Permeability and Diffusivity for Water Transport Through Hydrogel Membranes. *J. Membrane Science*. 214: 199 – 209.
- [21] Moradi, O., H. Modarress, and M. Noroozi. 2004. Experimental Study of Albumin and Lysozyme Adsorption Onto Acrylic Acid (AA) and 2-Hydroxyethyl Methacrylate (HEMA) Surfaces. *J. Colloid and Interface Science*. 271: 16 – 19.
- [22] Seidel, J. M. and S. M. Malmonge. 2000. Synthesis of PolyHEMA Hydrogels for Using as Biomaterials. Bulk and Solution Radical-initiated Polymerization Techniques. *Materials Research*. 3: 79 – 83.

- [23] Lucilene, D. M., D. P. T. S. Maria, and T. K. Lauro. 2003. HRP-based Amperometric Biosensor for the Polyphenols Determination in Vegetables Extract. *Sensors and Actuators B*. 96(3): 636 – 645.
- [24] Fishbein, W., K. Nagarajan, and W. Scuzzi. 1970. Urease Catalysis and Structure. VI. Correlation of Sedimentation Coefficients and Electrophoretic Mobilities for Polymeric Urease Isozymes. *J. Biol. Chem.* 245(22): 5985 – 5992.
- [25] Yoon, J. Y., J. H. Kim, and W. S. Kim. 1999. Mediator-free Phenol Sensor Based on Titania Sol-gel Encapsulation Matrix for Immobilization of Tyrosinase by A Vapor Deposition Method. *Colloids Surf.* 153: 413 – 419.
- [26] Anne, S., J. R Nicole, M. Claude, and C. Serge. 1999. A Miniaturized Urea Sensor Based on the Integration of Both Ammonium Based Urea Enzyme Field Effect Transistor and A Reference Field Effect Transistor in A Single Chip. *Talanta*. 50: 219 – 226.
- [27] Jun, Q. W., C. C. Jung, P. S. Tai, K. H. Shen, and B. H. Guang. 2003. pH-Based Potentiometrical Flow Injection Biosensor for Urea. *Sensors and Actuators B*. 91: 5 – 10.
- [28] Steinschaden, A., D. Adamovic, G. Jobst, R. Glatz, and G. Urban. 1997. Miniaturised Thin Film Conductometric Biosensor with High Dynamic Range and High Sensitivity. *Sensors and Actuators B*. 44: 365 – 369.
- [29] Dave, B. C., B. Dunn, J. S. Velentine, and J. I. Zink. 1994. Sol-gel Encapsulation Methods for Biosensors. *Anal. Chem.* 66: 1120A – 1127A.
- [30] Evtugyn, G. A., H. C. Budnikov, and E. B. Nikolskaya. 1998. Sensitivity and Selectivity of Electrochemical Enzyme Sensors for Inhibitor Determination. *Talanta* 46: 465 – 484.