

HADIAH

**PEMBUATAN ELEKTROD GLUKOSA
MENGUNAKAN PES KAYU ARANG**

OLEH

LEE WUI WUI

Disertasi bagi memenuhi sebahagian daripada keperluan kursus
KUE 400 Projek Penyelidikan

PUSAT PENGAJIAN SAINS KIMIA

UNIVERSITI SAINS MALAYSIA

PULAU PINANG

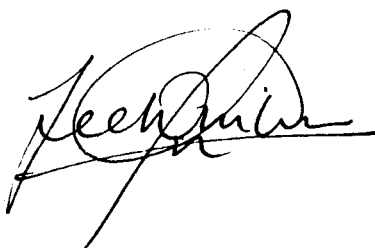
APRIL 1992

PENGHARGAAN

ADALAH DIUCAPKAN SETINGGI-TINGGI PENGHARGAAN KEPADA DR. SULAIMAN AB. GHANI ATAS SUMBANGAN DAN TUNJUKAJAR BELIAU DALAM MENJAYAKAN PROJEK SAYA INI.

PENGHARGAAN JUGA DIBERIKAN KEPADA ENCIK KASSIM, KAKI-TANGAN-KAKAITANGAN PUSAT PENGAJIAN SAINS KIMIA SERTA RAKAN-RAKAN SEKURSUS YANG TELAH MEMBERI BANTUAN KEPADA SAYA.

SEKIAN TERIMA KASIH!

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Lee Wui Wui', with a large, stylized flourish above the name.

(LEE WUI WUI)

A B S T R A K

Satu elektrod berasaskan enzim glukosa oksidasa telah disediakan untuk penentuan glukosa secara amperometrik. Voltamogram berkitar telah direkodkan. Elektrod berasaskan enzim ini diperbuat dari serbuk karbon(dari arang kayu), enzim glukosa oksidasa dan cecair nujol. Telah didapati bahawa had atasan bagi elektrod ini ialah 8.0×10^{-4} M. Gerakbalas elektrod ini adalah amat cepat tetapi kepekaannya boleh diperbaiki lagi. Panjang hayat elektrod ini ialah 5 hari.

Ujikaji atas kesan nujol terhadap pes karbon telah dijalankan. Telah didapati bahawa sekiranya pes yang disediakan itu adalah 'kering', penyediaan elektrod menjadi lebih susah. Namun begitu, sekiranya nujol digunakan dalam kandungan yang sangat tinggi, ia membentuk satu perintang. Namun begitu, elektrod glukosa oksidasa yang dibina ini mengandungi kandungan nujol yang agak tinggi kerana ini akan meminimakan bisingan latar belakang. Selain dari itu, kesan suatu elektrod aktif yang dihubungkan kepada pes karbon yang terbentuk juga dikaji. Didapati ada gangguan pada voltamogram yang dihasilkan.

ABSTRACT

The modification of the carbon paste electrodes by incorporation of the enzyme glucose oxidase is described. The electrode contained carbon powder (from charcoal), glucose oxidase and nujol. The resulting probe is operated as amperometric glucose sensors. Cyclic voltammograms were recorded. Calibration ranges have been obtained up to 8.0×10^{-4} g/L for the electrode. The response was rapid. However sensitivity can be improved. Shelf life for the electrode is five days.

Tests were also carried out on the effect of nujol on the carbon pastes made. The packing of electrodes were made difficult by rather dry paste. However, an inhibitory action was displayed if too high an amount of nujol was used. The content of nujol in the carbon paste made for the electrode was rather high to minimise background noise. It also ensured that packing could be done with minimal problem. Furthermore, the effect of close contact between an active electrode; for example copper, and the carbon paste was tested. Voltammograms recorded showed disturbances.

JADUAL KANDUNGAN

Muka surat Judul	i
Penghargaan	ii
Abstrak	iii
Jadual Kandungan	v
Senarai Jadual	vi
Senarai Rajah	vii

Jadual Kandungan

Bab 1 Pengenalan

1 Biopenderia	1
1.1 Kebaikan Biopenderia	1
1.2 Jenis-Jenis Biopenderia	2
1.2.1 Elektrod Pengkonduksi Garam Organik	2
1.2.2 Elektrod Imuno	5
1.2.3 Biopenderia Mikrobil	8
1.2.4 Penderia Termometri	11
1.3 Biopenderia berasaskan Enzim	12
1.3.1 Pengimobilan Enzim	16
1.3.2 Jenis-jenis Biopenderia berasaskan Enzim	17
1.4 Biopenderia Glukosa berasaskan Enzim	20
1.4.1 Metodologi Pembentukan Elektrod Enzim Glukosa	20
1.5 Kegunaan Biopenderia	25
1.6 Objektif Penyelidikan	26

Bab 2 Eksperimental

2.1 Reagen-reagen yang digunakan	28
2.2 Keadaan-keadaan Eksperimental	28
2.3 Penyediaan Elektrod-Elektrod	29
2.3.1 Pembentukan Elektrod Argentum/Argentum klorida	29

2.3.2	Penyediaan Elektrod Pelawan:Elektrod Platinum	31
2.3.3	Penyediaan Elektrod Kerja:Elektrod Pes Karbon	31
2.3.3.1	Penyediaan Serbuk Karbon	31
2.3.3.2	Pembersihan Serbuk Karbon	32
2.3.3.3	Penyediaan Elektrod Karbon	34
2.4	Penyediaan Pes Karbon	35
2.4.1	Perbandingan Voltmetri Berkitar Yang Didapati Dari Batang dan Pes Karbon	35
2.4.2	Pengaruh Cucukan Elektrod Kuprum ke dalam Pes Karbon	36
2.4.3	Pengaruh Nujol terhadap Pes Karbon	36
2.4.4	Pembuatan Pes-pes Karbon dengan Penggunaan Glukosa Oksidasa	37
2.5	Penyediaan Larutan Tampan Fosfat	39
2.6	Penyediaan Larutan Piawai D- Glukosa Monohidrat	40
2.7	Langkah-langkah Berjaga	40
Bab 3	Keputusan dan Perbincangan	
3.1	Perbandingan Voltametri Berkitar yang didapati dari Batang dan Pes Karbon	42
3.2	Kesan Dawai Kuprum ke atas Pes Karbon	43
3.3	Pengaruh Nujol terhadap Pes Karbon	45
3.4	Pembinaan Pes Karbon Berasaskan Enzim Glukosa Oksidasa	50
Bab 4	Kesimpulan	70
	Rujukan	72
	Lampiran I	74
	Lampiran II	78
	Lampiran III	79

Senarai Jadual

2.1	Jadual komposisi berlainan bagi Elektrod-elektrod	35
3.1	Jadual menunjukkan Isipadu Larutan Piawai Glukosa yang digunakan serta Jarak Dari Garis $O(x)$ bagi Elektrod sebelum Pelaziman	59
3.2	Jadual menunjukkan Isipadu Larutan Piawai Glukosa yang digunakan serta Jarak Dari Garis $O(x)$ bagi Elektrod 1 hari selepas Pelaziman	60
3.3	Jadual menunjukkan Isipadu Larutan Piawai Glukosa yang digunakan serta Jarak Dari Garis $O(x)$ bagi Elektrod 3 hari selepas Pelaziman	60
3.4	Jadual menunjukkan Isipadu Larutan Piawai Glukosa yang digunakan serta Jarak Dari Garis $O(x)$ bagi Elektrod 5 hari selepas Pelaziman	64
3.2	Jadual menunjukkan Isipadu Larutan Piawai Glukosa yang digunakan serta Jarak Dari Garis $O(x)$ bagi Elektrod 8 hari selepas Pelaziman	64

Senarai Rajah

1.1	Struktur bentuk TTF dan TCNQ masing-masing	3
1.2	Struktur Molekul beberapa Penerima dan Penderma yang biasa	4
1.3	Susunan kawasan variabel dan ikatan sulfit molekul IgG	6
1.4	Biopenderia mikrobial jenis Pengukuran Aktiviti Pernafasan	9
1.5	Biopenderia Mikrobial jenis pengukuran Metabolit Aktif	9
1.6	Gambarajah Berskema Elektrod Enzim Amperometri	14
1.7	3 Kaedah bagi Pembentukan satu Biopenderia Kolesterol	17
1.8	Skema Amplifikasi bagi laktat	19
2.1	Susunan berskema Alat-alatan yang digunakan	29
2.2	Rupabentuk Elektrod Ag/AgCl	30
2.3	Pembersihan Serbuk Karbon	33
2.4	Rupabentuk Elektrod Kerja Pes Karbon	35

3.1	Graf Voltametri Berkitar yang didapati bagi a) Batang Karbon b) Pes Karbon	43
3.2a	Voltamogram apabila dawai Kuprum tercucuk masuk Pes Karbon.	44
3.2b	Dwilapisan Elektrik yang terbentuk Pada Permukaan Elektrod	45
3.3	Voltamogram yang didapati dengan nisbah Nujol yang berbeza	49
3.4	Voltamogram bagi Elektrod I	50
3.5	Voltamogram Yang didapati bagi Elektrod II	53
3.6	Voltamogram Yang didapati bagi Elektrod III	55
3.7	Voltamogram Yang didapati bagi Elektrod III setelah Pes terurai	55
3.8	Voltamogram Yang didapati bagi Elektrod IV	57
3.9	Voltamogram Yang didapati bagi Elektrod V	58
3.10	Keluk Tentukuran bagi Elektrod Sebelum Pelaziman	60
3.11	Keluk Tentukuran bagi Elektrod 1 hari Selepas Pelaziman	62
3.12	Keluk Tentukuran bagi Elektrod 3 hari Selepas Pelaziman	63
3.13	Keluk Tentukuran bagi Elektrod 5 hari Selepas Pelaziman	65
3.14	Keluk Tentukuran bagi Elektrod 8 hari Selepas Pelaziman	66
L1	Voltamogram yang menunjukkan pengoksidaan dan Penurunan suatu spesies secara amnya	75
L2	Voltamogram menunjukkan bagaimana jarak dari Garis 0 didapati	79

PENGENALAN

BAB 1 P E N G E N A L A N

1 **BIOPENDERIA**

Perkembangan teknik-teknik analisis berasaskan alat-alatan penderia yang kecil untuk kegunaan dalam analisis klinikal, pemantauan persekitaran dan pengawalan bioproses kian meningkat.[1] Biopenderia merupakan gabungan bahan-bahan biologis dan transduser yang terdiri dari alatan elektrokimia. Ia merupakan kombinasi kaedah-kaedah biologis yang 'basah' dan kaedah pengalatan yang 'kering' yang telah berkembang secara berasingan tetapi kini dikupelkan bersama-sama.[2]

1.1 **Kebaikan Biopenderia-biopenderia**

Terdapat beberapa kebaikan dalam penggunaan kaedah penukaran satu tindakbalas biologis kepada satu isyarat elektrik. Kebaikan-kebaikan ini adalah:

- a) Kespesifikan yang tinggi.
- b) Kesenangan kegunaan
- c) Analisis dijalankan berasaskan tindakbalas biologisnya dan bukan struktur molekul.

- d) Alatan elektrokimia pula dapat digunakan kepada sistem-sistem biologi yang berbeza dengan penggunaan prinsip yang asas.
- e) Sumber yang digunakan untuk menghasilkannya adalah tidak spesifik.
- f) Prinsip operasi adalah secara relatif lebih senang.

1.2 Jenis-jenis biopenderia

Terdapat beberapa jenis biopenderia. Mereka adalah :

- a) Elektrod pengkonduksi garam Organik
- b) Elektrod imuno
- c) Biopenderia Mikrobial
- d) Elektrod termoelektrik
- e) Elektrod berasaskan enzim

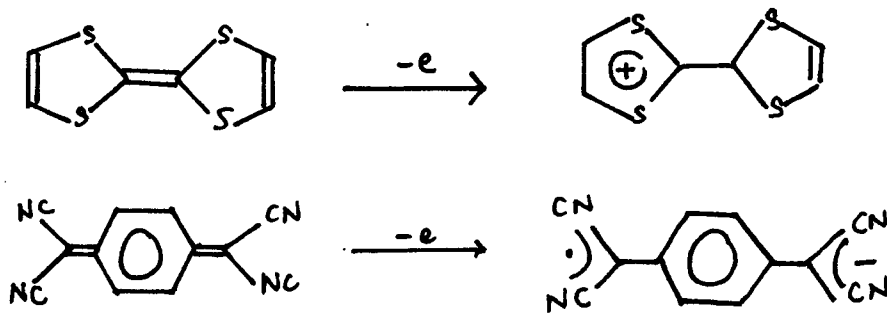
1.2.1 Elektrod pengkonduksi garam organik[2]

Elektrod pengkonduksi garam organik telah pertama sekali dikaji dalam tahun 50-an. Biasanya pengkonduksi garam organik terdiri dari gabungan satu penderma (donor) dan satu penerima (acceptor). Biasanya spesies yang digunakan merupakan molekul planar dengan π elek-

tron yang dinyahtempatkan. Beberapa ciri-ciri persamaan diantara garam-garam konduktor didapati:

- a) Struktur bertindihan yang perlu dikelompokkan iaitu kesemua molekul penderma berada pada satu kumpulan dan molekul penerima pula dalam kumpulan yang lain. Sistem-sistem dimana penerima dan penderma dicampurkan bersama adalah sistem penebat.
- b) Ia adalah penting bahawa penderma atau penerima membentuk satu sekstet aromatik dengan kehilangan atau penerimaan satu elektron.

Lihat pada Rajah 1.1



Rajah 1.1. Struktur bentuk-bentuk TTF dan TCNQ masing-masing. Satu sekstet aromatik yang baru dibentuk. Kedua-dua TTF dan TCNQ menyumbang kepada kekonduksian hablur TTF-TCNQ.

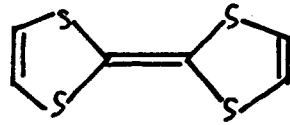
- c) Adalah penting terdapat pemindahan caj separuh antara kumpulan-kumpulan. Sekiranya pemindahan cas adalah sempurna, pemindahan cas tidak berlaku kerana kini ia berbentuk penebat.

Beberapa contoh molekul penerima dan penderma didapati

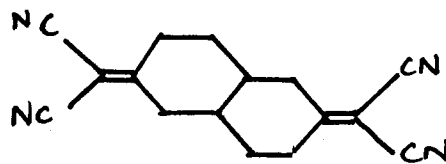
dalam

Rajah

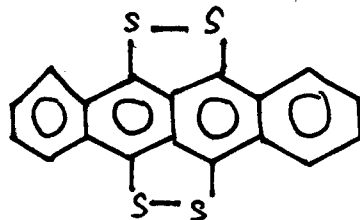
1.2



TTF



TNAP



TTN

Rajah 1.2. Struktur molekul beberapa penerima dan penderma yang biasa

R.C Whelan dan J.L Gillson telah menyelidik tindakbalas menggunakan pelbagai jenis struktur penderma dan penerima. Telah didapati lebih dari 80 kompleks berkonduksi yang ditemui.[3] Satu lagi ujikaji yang dijalankan [4] telah dapat membentuk satu kompleks yakni tetrasianoquinodimetana (TCNQ) sebagai penerima dan membentuk 3 jenis kompleks dengan molekul penderma.

TTF-TCNQ merupakan;

- a) Molekul kompleks dengan kekonduksian elektrik yang agak rendah.

- b) Garam ion radikal mudah
- c) Garam ion radikal kompleks

Elektrod ini adalah stabil pada satu julat keupayaan dan bertindak sebagai elektrod lengai dan sekiranya melepasi renj ini, elektrod diturun atau dioksidakan.[4]

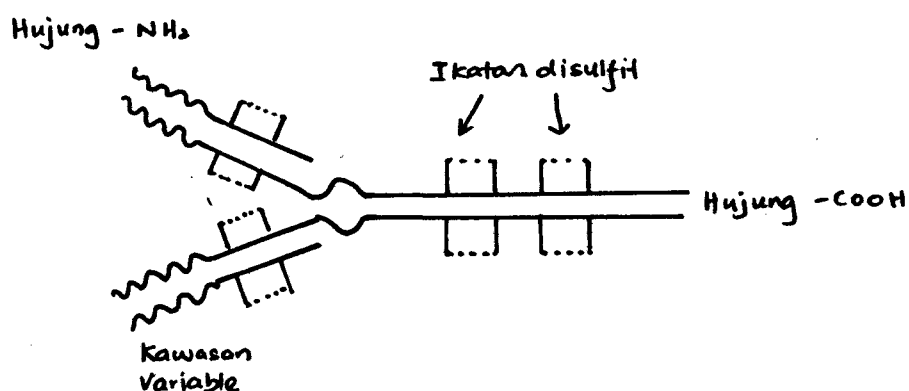
1.2.2 Elektrod imuno[2]

Biasanya dalam kimia klinikal, julat kepekatan analit adalah sangat tinggi, lebih dari 10^{-3} M untuk spesies-spesies seperti glukos dan kolesterol kepada kurang dari 10^{-9} M bagi beberapa jenis dadah dan hormon.

Kaedah imunologi digunakan bagi pengesanan kepekatan-kepekatan yang rendah ini. Jadi apa yang amat penting ialah pengesanan ini bukan sahaja peka tetapi amat spesifik. Ini adalah kerana pada kepekatan yang begitu rendah, kandungan surih bendasing juga dapat mengganggu bacaan. Sampai sekarang, masih lagi tiada satu elektrod imuno yang berjaya dibina. Biasanya apa yang dapat dilakukan ialah elektrokimia imunocerakin. Spesies haiwan dapat mensintesisikan sehingga 10^7 - 10^8 antibodi dengan kespesifikan berbeza. Ini merupakan

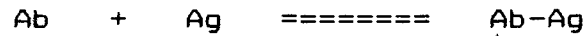
satu sumber yang 'versatile' dalam memperoleh kespesifikan yang tinggi bagi satu julat ciri-ciri kimia yang lebar.[5]

Antibodi berada dalam kumpulan glikoprotein yang dikenali sebagai immunoglobulin. Ia dirangsangkan oleh kehadiran bahan asing yang dipanggil antigen ataupun imunogen. Satu haptan merupakan satu bahan berberat molekul rendah yang merupakan antigen tetapi untuk bertindak imunogenik, haptan mesti diikat kepada satu makromolekul. Kespesifikan satu antibodi adalah diarahkan kepada satu tapak atas antigen yang dikenali sebagai epitop. Biasanya antibodi terdiri dari dua jenis rantai polipeptida, yakni rantai berat (50 - 70 kd) dan rantai ringan (lebih kurang 25 kd). Satu struktur yang berbentuk Y dihasilkan yang diikat semula dengan ikatan disulfid seperti dalam Rajah 1.3



Rajah 1.3. Susunan kawasan variabel dan ikatan sulfid molekul IgB

Segmen-segmen terminal-amino yang bertanggungjawab dalam mengenali dan mengikat antigen. Antibodi (Ab) akan mengikat dengan antigen (Ag) membentuk kompleks



Kaedah imunoassay merupakan teknik yang berdasarkan tindakbalas antara antigen dan antibodi bagi mengukur kepekatan bahan tindakbalas dalam larutan. Kaedah imunocerakin dibahagikan kepada 2 jenis yakni jenis homogen dan heterogen. Sistem homogen tidak memerlukan pemisahan antara antigen yang diikat dan bebas. Ia bergantung kepada perbezaan aktiviti elektrik atas pembentukan kompleks antibodi antigen. Kaedah yang lebih sensitif ialah kaedah sistem heterogen.

Gabungan kespesifikan antibodi dan had pengesanan yang rendah merupakan sebab-sebab mengapa kaedah ini kian mendapat perhatian.[5]

1.2.3 Biopenderia mikrobil

Penderia mikrobil terdiri dari mikroorganisme yang diimobilkan dan alatan elektrokimia yang dapat mengawal proses-proses biokimia.

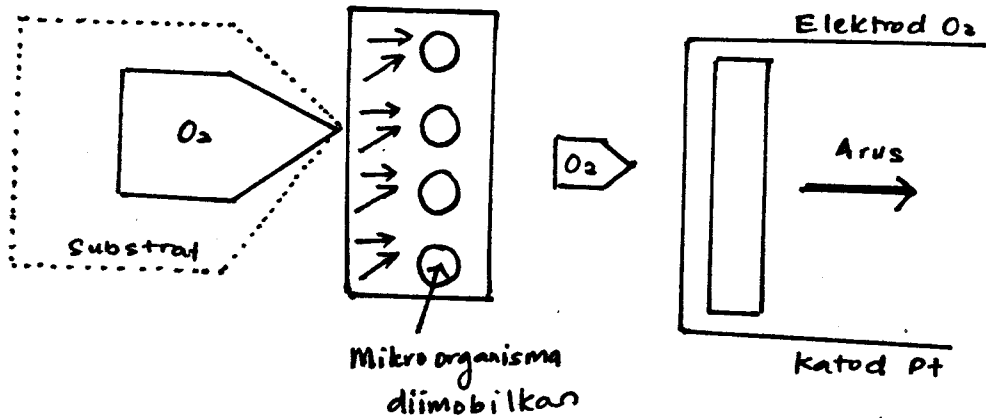
Kebaikan biopenderia mikrobil adalah :

- a) Ianya kurang peka terhadap pencatan oleh pelarut dan mempunyai penghadan tinggi terhadap pH, suhu.
- b) Hayatnya adalah lebih panjang.
- c) Harganya lebih murah.

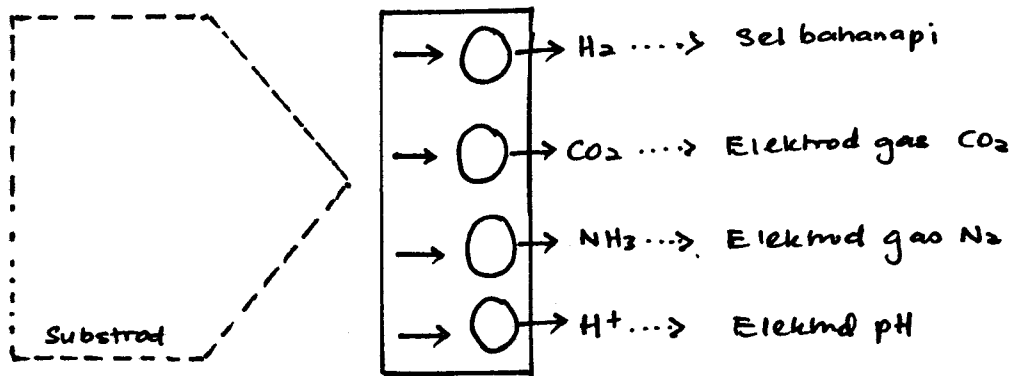
Keburukan biopenderia mikrobil :

- a) Masa untuk gerakbalas yang lebih lama.
- b) Memerlukan lebih masa untuk kembali ke signal garis dasar, kesan 'memory'.
- c) Sel-sel mengandungi banyak enzim dan oleh itu, perhatian untuk memastikan pemilihan yang betul dilakukan.

Mikrobial biopenderia boleh diklasifikasikan sebagai jenis pengukuran aktiviti pernafasan atau jenis pengukuran metabolit aktif. (Rujuk kepada Rajah 1.4 dan 1.5)



Rajah 1.4. Biopenderia mikrobil jenis pengukuran aktiviti pernafasan



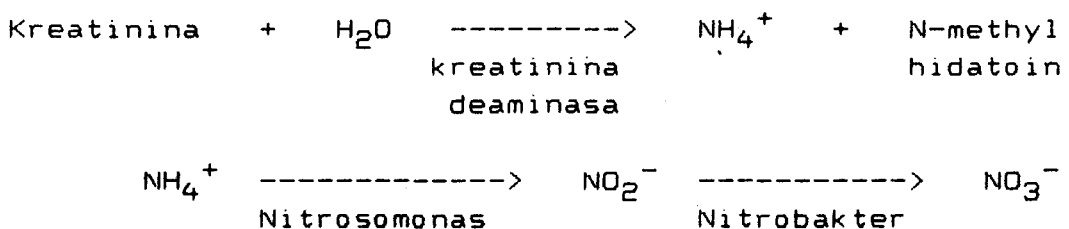
Rajah 1.5. Biopenderia mikrobial jenis pengukuran metabolit aktif.

Bagi jenis yang pertama, satu biopenderia mikrobil dicampurkan ke dalam larutan penimbal yang tepu dengan

oksigen. Dengan penambahan substrat, aktiviti pernafasan mikroorganismenya meningkat dan kepekatan oksigen menurun. Ini dapat diukur dengan menggunakan elektrod oksigen. Jenis yang lain digunakan untuk mengesan hidrogen, karbon dioksida, ammonia dan asid-asid organik yang lain.

Biopenderia mikrobial boleh digunakan untuk membina suatu biopenderia hibrid. Disini dengan kepilihan rendah penderia kreatinina telah dibina. [8]

Kreatinina deaminasa menghidrolisiskan kreatinina kepada N-metilhidantoin dan ion ammonium. Ammonia yang dibebaskan dioksidakan kepada nitrit dan nitrat oleh bakteria penitritan. Bakteria ini merupakan campuran kultur Nitrosomonas dan Nitrobakter. [8]



1.2.4 Penderia Termometrik

Kaedah kalorimetri telah digunakan dalam pembinaan penderia-penderia. Ia memberi satu kaedah pengesanan yang peka kepada sifat-sifat optik sampel. Tindakbalas enzimatik berlaku dalam lengkungan 20-100 kJ mol⁻¹, satu pertukaran yang tinggi dan oleh itu, gabungan termometri dan enzim diperlukan. Biasanya sistem yang digunakan terdiri dari satu prob enzim termal di mana enzim diikatkan kepada transducer suhu dan satu termistor. Kaedah ini kian mendapat sambutan kerana :

- a) Kesenangan kegunaan
- b) Pengawalan
- c) Kesenangan pengoperatan

1.2.5 Biopenderia berdasarkan enzim

Elektrod jenis ini merupakan tumpuan utama kajian ini dan akan dibincangkan dengan lebih jelas dalam topik yang berikutnya.

1.3 Biopenderia berasaskan Enzim

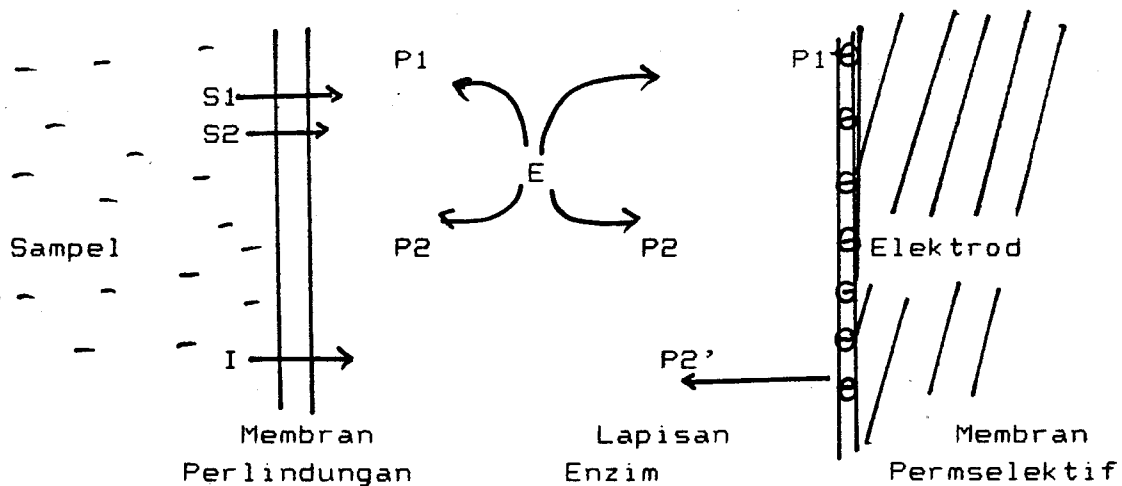
Penggunaan biopenderia berdasarkan enzim telah semakin meningkat dalam aplikasi klinikal, persekitaran, pertanian dan bioteknikal. Biopenderia yang berasaskan enzim telah banyak dikaji dan dibentuk sejak dari awal lagi.[2] Elektrod berasaskan enzim merupakan satu produk antaramuka apa-apa jenis penderia elektrokimia kepada satu lapisan agak nipis enzim yang diimobilkan. Enzim biasanya diimobilkan oleh penangkapan gel dan dipegang dengan kuat kepada elektrod oleh membran separa telap.[1]

Biopenderia berdasarkan enzim telah banyak dikaji dengan pelbagai substrat. Biasanya enzim yang digunakan memungkinkan tindakbalas redoks di mana kadarnya berkadaran terus dengan kepekatan analit.[2] Tindakbalas elektrod yang dihasilkan itu ialah melalui elektrolisis hasil elektrolit enzim yang dirangsangkan. Operasi satu elektrod memerlukan penyerapan analit dari larutan menerusi membran separa telap dan medium pengimobilan kepada tapak-tapak enzim, bertindakbalas dengan enzim dan akhirnya mengesan produk reaksi oleh elektrod sebelum produk kembali kepada larutan.

Jadi perkembangan suatu reaksi adalah diukur melalui pembentukan suatu hasil tindakbalas atau kehilangan suatu bahan tindakbalas. Sekiranya hasil tindakbalas atau bahan tindakbalas adalah elektroaktif, kepekatan-nya dapat dimonitor secara terus. Biasanya enzim yang digunakan ialah enzim-enzim yang oksipenurun tetapi enzim-enzim hidrolitik seperti alkali fosfotasa juga digunakan. Sistem yang paling biasa digunakan adalah pemantauan kehilangan oksigen atau kewujudan H_2O_2 .

Bagi enzim-enzim yang digunakan dalam satu penderia, sifat-sifat berikut harus diperolehi:

- a) Nombor 'turnover' yang tinggi
- b) Substrat k_m rendah, produk k_m tinggi
- c) Penstoran dalam bentuk bebas atau konjugat yang stabil.
- d) Senang mendapatkan enzim yang tulen.
- e) Aktiviti enzim senang dikesan.
- f) Tiada enzim endogenasa atau bahan mengganggu dalam sampel ujian.
- g) Keadaan bagi kegunaan enzim seiringan dengan keadaan ujikaji dijalankan yakni pH, kekuatan ionik dan lain-lain.



Rajah 1.6. Gambarajah skematik elektrod enzim amperometrik. S1,S2, substrat; P1,P2, produk; P2', produk tindakbalas elektrokimia P2; I,Gangguan; E, Enzim.

Dari Rajah 1.6, dapat dilihat satu penderia mempunyai beberapa komponen penting. Biasanya elemen pengesan elektrod yang digunakan diperbuat dari platinum tetapi emas dan karbon juga telah digunakan. Lapisan enzim terbentuk bersebelahan dengan elektrod. Enzim diperangkapkan dalam gel menerusi ikatan kovalen kepada satu membran penyokong. Membran perlindungan pula mempunyai beberapa fungsi dalam satu elektrod. Pertama, ia merupakan satu lapisan yang menghalang molekul-molekul besar seperti protein dari memasuki lapisan enzim. Ini adalah kerana kadangkala kandungan dalam cecair biologi mungkin menghapuskan H_2O_2 yang terbentuk dalam lapisan enzim. Selain dari itu, ia menghalang kehilangan enzim dari larutan sampel.

Membran juga bertindak sebagai satu rintangan penyerapan bagi substrat itu sendiri.

Kadangkala beberapa enzim dimasukkan bersama kedalam penderia yang sama. Terdapat beberapa sebab mengapa cara ini dilakukan:

- a) Perubahan pada satu analit disebabkan oleh satu rangkaian tindakbalas yang dapat dikesan secara elektrokimia.
- b) Penukaran bendasing dalam sampel kepada bentuk-bentuk yang tidak aktif.
- c) 'Recycle' reaksi untuk memperbaiki 'turnover' enzimatik.

1.3.1 Pengimobilan Enzim

Dalam penambahan enzim, terdapat teknik yang paling penting ialah pengimobilan enzim. Pengimobilan mempunyai beberapa kesan keatas kestabilan enzim.[7] Suatu penderia yang berfungsi dengan betul bergantung kepada sifat-sifat yang ada pada enzim tersebut.[2] Pengimobilan dapat meningkatkan kestabilan termal dan kimia enzim-enzim yang diimobilkan berbanding dengan yang tidak. Namun ada juga yang kurang menunjukkan

perubahan-perubahan yang wujud dalam kestabilan suatu enzim[7] Biasanya enzim-enzim oksipenurunan adalah amat sensitif terhadap pengimobilan dan menghasilkan nilai aktiviti spesifik 5 - 20% enzim terlarut.

Terdapat beberapa kebaikan dalam penggunaan penderia berasaskan enzim[1]:

- a) Penentuan analit dalam kompleks dapat ditentukan dengan senang tanpa prapengolahan yang kompleks.
- b) Kegunaan sampel-sampel campuran yang kecil.
- c) Dapat digunakan semula untuk kegunaan selanjutnya.

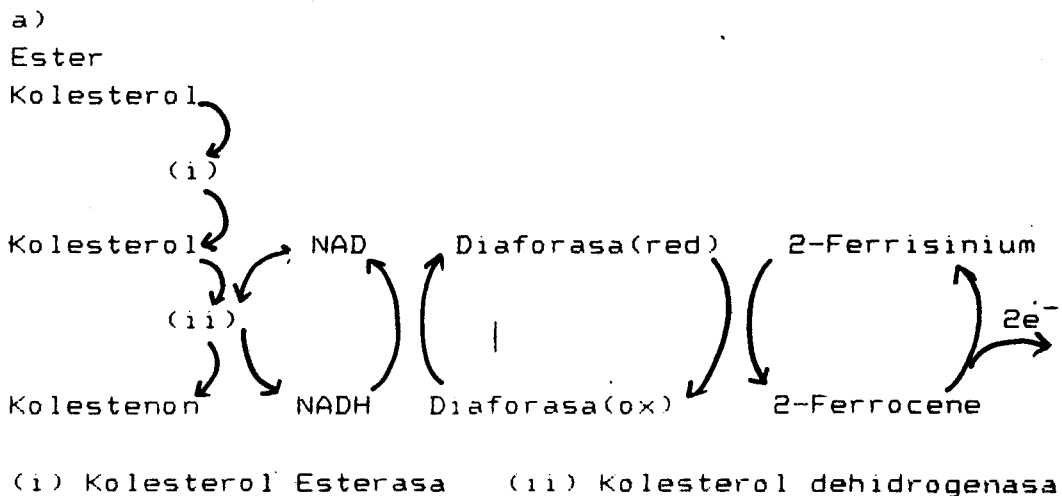
Namun begitu keadaan elektrod enzim yang diimobilkan bergantung kepada faktor-faktor seperti:

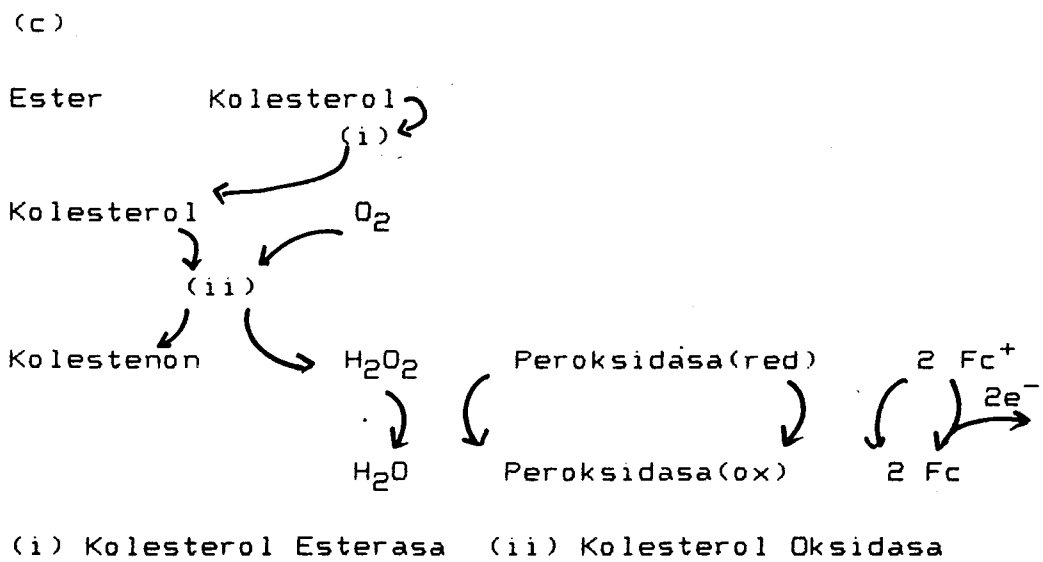
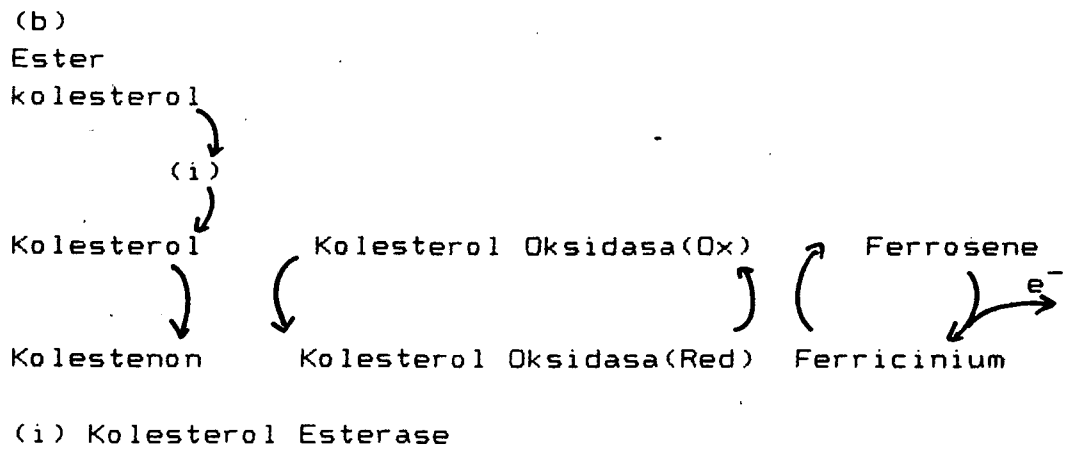
- a) Kaedah pengimobilan
- b) Keadaan kimia dan fizikal
- c) Kestabilan dan lebar membran untuk menangkap enzim
- d) Aktiviti dan kestabilan enzim bila diimobilkan
- e) Kestabilan penderia asas
- f) Masa gerakbalas
- g) Keadaan penstoran

1.3.2 Jenis -jenis Biopenderia berasaskan Enzim

Sejak dari pembinaan satu biopenderia berasaskan enzim seperti yang diterangkan oleh Clark[9], terdapat pelbagai aplikasi yang menggunakan pelbagai jenis substrat. Penderia berasaskan enzim mempunyai julat linear yang panjang kerana gerakbalas penderia itu dikawal oleh penyerapan menerusi membran dan bukan kinetik enzim[2]

M.R. Ball, J.E. Frew dan rakan-rakan [10] telah merekakan satu biopenderia kolesterol. Didapati terdapat tiga cara bagi merekabentuk penderia bagi kolesterol dan ianya diringkaskan dalam Rajah 1.7 dibawah.





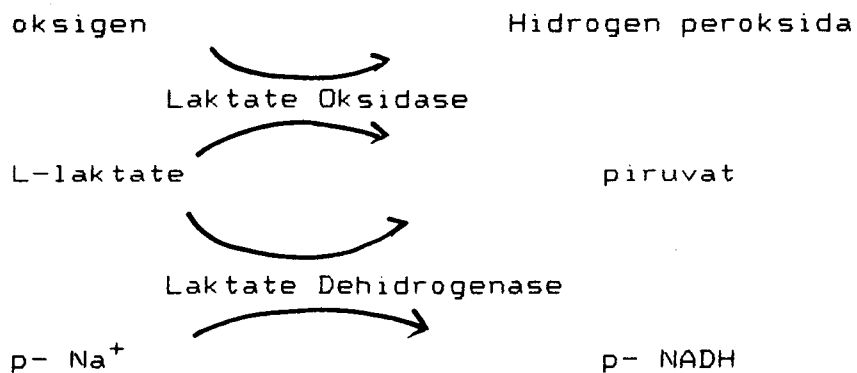
Rajah 1.7. 3 kaedah bagi pembentukan satu biopenderia kolesterol.

(a) Cerakin Dehidrogenasa (b) Cerakin oksidasa (c) Cerakin Peroksidasa/oksidasa

Elektrod yang menggunakan enzim adenosin deaminasa juga telah dibentuk. Elektrod ini digunakan untuk menganalisis keadaan kinetik elektrod tersebut.[11] Ini adalah untuk menentukan samada enzim-enzim ini adalah

sesuai digunakan dalam penentuan adenosine.

Y. Regau dan A.J. Haler pula telah menjalankan satu tindakbalas untuk menentukan anion laktat[12] dengan menggunakan amplifikasi enzim laktat oksidasa dan laktat dehidrogenasa digunakan. Biasanya kaedah amplifikasi yang digunakan ini akan menghasilkan bacaan yang baik dan lebih peka. Ianya biasanya digunakan bagi kuantiti yang kecil dan juga dimana pengkuantitian susah dijalankan. Rajah 1.8 menunjukkan skema amplifikasi bagi laktate.



Rajah 1.8. Skema Amplifikasi bagi Laktat

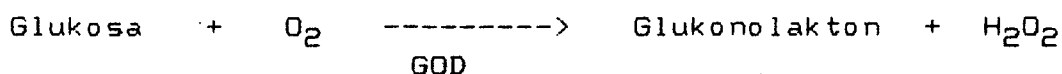
Ukuran protein dalam produk-produk tenusu menggunakan elektrod enzim juga telah dikaji.[13] Elektrod menggunakan glutraldehid dan elektrod oksigen digunakan. Elektrod oksigen mengawal peratusan oksigen yang dihabiskan oleh gluterladehid. Kaedah ini membenarkan sampel-sampel dianalisis secara terus tanpa kaedah

prapengolahan. G.D. Christian, et al[15] telah mereka satu elektrod pes karbon yang digunakan untuk mengukur lipid. Enzim yang digunakan ialah fosfolipid. Elektrod yang dihasilkan adalah baik. Namun begitu, banyak dari kajian pembinaan biopenderia yang dibuat adalah biopenderia glukos.

1.4 Biopenderia Glukosa berasaskan enzim

Glukosa merupakan salah satu dari bahan organik yang dapat ditentukan dengan menggunakan fungsi biomangkin enzim. Kaedah-kaedah berenzim bagi penentuan glukosa adalah berdasarkan penggunaan biomangkin enzim glukosa oksidasa atau glukosa dehidrogenasa. [15]

Bagi Glukosa oksidasa



Ciri-ciri dan prestasi penderia elektrokimia berasaskan enzim telah dianalisis dan dikritis secara meluas.[14] Biasanya enzim glukosa oksidasa digunakan dengan lebih kerap. Melalui hasil tindakbalas H_2O_2 , tindakbalas dapat ditentukan dengan beberapa kaedah. Salah satu kaedah yang digunakan ialah pengukuran secara amperome-

glukosa yang lebih stabil. Dalam kehadiran glukosa dan trien, polimer akan membentuk satu filem yang berangkaisilang atas permukaan elektrod. Ini telah menghapuskan keperluan satu membran untuk pengkupelan redoks dan enzim.

Selain dari itu satu model bagi elektrod ini didapati melalui simulasi berdigit dan diaplikasi kepada sistem glukosa oksidasa yang diimobilkan dalam satu gel poliakrilamida. Kepekatan enzim dalam gel adalah 0.2 g/ml. Pempolimeran dilakukan dengan penambahan 5 - 10 titik 50 / larutan akuas N,N,N',N'-tetrametiletilenediamina kepada campuran reagen berangkaisilang monomer dengan tambahan 1 ml 1% kalium persulfat. Selepas itu lapisan enzim diletakkan ke atas permukaan elektrod dan dikukuhkan dengan jaring nilon dan pita teflon. Ia harus disimpan semasa tidak digunakan dalam larutan penimbal fosfat pH 7.4.[19]

Satu kaedah yang digunakan di mana glukosa oksidasa diimobilkan dalam kawasan kumpulan hujung dalam satu lapisan gandadua yang dibentuk sendiri dalam templat berliang aluminium oksida. Pengimobilan dijalankan dengan menggunakan (ferrosenil-metil)dimetiloktadesi-

trik. Enzim elektrod amperometri merupakan satu kombinasi mungkin berenzim dan pengukuran arus pada satu keupayaan yang dikawal.[17]

Beberapa kaedah telah dilakukan untuk pengimobilan enzim keatas elektrod. Enzim dapat diikat secara terus menerusi pengikatan kepada bahan elektrod bekerja seperti karbon bak kaca. Ia dapat diperangkapkan dalam satu lapisan poliakrilamida, gel gelatin atau polipirol. Satu kaedah lagi ialah pengimobilan atas membran yang memisahkan elektrod bekerja dengan larutan sampel.[17]

1.4.1 Metodologi Pembentukan Elektrod Enzim Glukos

Brian A. Gregg dan Adam Heller[18] telah menyediakan satu elektrod di mana glukosa oksidasa diikat kepada elektrod oleh kompleks elektrostatik menerusi ikatan kovalen dengan polimer redoks. Terdapat satu pengaliran elektrik dari enzim menerusi polimer ke elektrod. Polimer yang digunakan ialah kompleks poli(vinilpiridina) dengan $[Os-(bpy)_2Cl_2]^{2+}$. Kedua-dua ini dihubungkan menerusi kofaktor prostetik flavin adeninedinukleotida (FAD). Trietilenaamina(trien) membentuk satu larutan

lammonium amfifil dan membentuk lapisan luar lapisan gandadua.

Namun begitu, terdapat banyak pengimobilan yang dilakukan atas grafit. Terdapat dua jenis; grafit batang dan pes grafit. Dalam satu kajian yang dilakukan oleh Adams[21], didapati bahawa pes grafit menghasilkan bacaan yang lebih baik berbanding dengan grafit batang. Beliau telah mencampurkan karbon dengan bromoform dalam nisbah 1g kepada 7 ml bromoform.

Sejak dari tahun lima puluhan banyak kajian telah dijalankan untuk mengkaji penderia yang menggunakan pes karbon ini. Satu lagi ujikaji telah dijalankan oleh Olson[22] di mana 6 g grafit dan 4 ml bromonaftilina telah dicampur dan diukur arus puncaknya. Didapati arus puncaknya adalah berkadaran kepada luas permukaan elektrod. Ini bermakna jika nisbah cecair organik kepada karbon meningkat maka arus puncak menurun. Jadi, lebih 'kering' pes tersebut lebih peka lagi elektrod yang dibina.

Beberapa penyelidikan yang telah dijalankan untuk mendapatkan CPE yang sesuai untuk digunakan dalam teknik voltametri dalam sistem pelarut bukan

akueus.[23] Satu agen aktif permukaan telah ditambah ke dalam CPE itu. Ini disediakan dengan mencampurkan 3.3 g karbon, 1.4 g natrium lauril sulfat dan 2.5 ml nujol. Lindquist pula telah menyediakan satu CPE dengan julat keupayaan anodik yang lebih lebar.[24] Pes ini diperbuat dari 10 g grafit dan 5.6 g asid seresin dan 1.4 g paraffin. Pes yang homogen ini disediakan setelah pencampuran bahan-bahan ini dipanaskan ke 1000°C.

Dalam pembinaan elektrod enzim, kejayaan bergantung ke pada pengimobilan enzim diatas elektrod penyokong. Salah satu cara pengimobilan yang digunakan ialah dimana sejumlah kecil glukosa oksidasa(GOD) dimasukkan ke dalam elektrod penyokong yang terdiri daripada pes grafit.[16] Jumlah yang digunakan ialah 100 mg C, 5 mg GOD dan 10 ul minyak silikon. Isyarat disukat menggunakan sistem suntikan aliran. Bacaan yang didapati adalah cukup memuaskan.

Kini, penggunaan 'mediator' dalam penyediaan pes karbon kian meluas. 'Mediator' yang pertama digunakan ialah Flavin adenine dinukleotida (FAD).[26] Ion ferrinium juga digunakan sebagai satu 'mediator' yang