

BIOSENSOR UNTUK ANALISIS UREA BERDASARKAN PADA APLIKASI ENZIM UREASE DAN ELEKTRODA TUNGSTEN

Bambang Widihastono

Puslitbang Kimia Terapan LIPI, Jalan Cisitu, Bandung

INTISARI

Suatu biosensor potensiometrik telah dikembangkan untuk analisis urea dalam cairan tubuh. Sensor tersebut dirancang dengan mengkombinasikan elektroda kawat tungsten dengan enzim urease yang diimmobilisasi secara fisik pada polimer polivinil klorida (PVC). Fabrikasi sensor dilakukan dengan melapis permukaan kawat tungsten dengan enzim urease yang sudah diimmobilisasi. Elektroda tungsten mendeteksi perubahan pH larutan yang dihasilkan dari reaksi hidrolisis enzimatik dari urea. Perubahan pH tersebut diperoleh hampir sebanding dengan log konsentrasi urea dalam larutan cuplikan. Respon dari sensor memberikan hubungan yang hampir linier dengan log konsentrasi urea pada rentang 0,1 - 10,0 mM, dan sensor memberikan kemiringan kurva kalibrasi sebesar 52 mV.

ABSTRACT

This study describes the development of a potentiometric biosensor for the determination of urea. The sensor was constructed by combining a tungsten wire with an enzyme, urease, physically immobilized in polyvinylchloride (PVC). The fabrication of the sensor was carried out by coating a tungsten wire with the immobilized urease. The changes in pH resulted from the enzyme-catalyzed hydrolysis of urea is measured with the tungsten electrode and shown to be proportional to the log of concentration of urea in sample solutions over a limited concentration range. Urea sensor prepared in this study gives an almost linear response with the log of concentration in the range of 0.1 - 10.0 mM, and the calibration slope was found to be 52 mV per decade change in urea concentration.

PENDAHULUAN

Beberapa metode imobilisasi enzim urease pada berbagai elektroda logam seperti antimon dan iridium dioksida [1-4] dan pada elektroda ion selektif [5-10] untuk pembuatan sensor yang sensitif terhadap urea telah dipublikasi. Pengembangan sensor ini diperlukan bagi keperluan analisis urea untuk keperluan diagnosa yang biasa dilakukan secara rutin di laboratorium klinis. Didalam tubuh manusia, urea merupakan hasil metabolisme nitrogen. Pasien sakit ginjal biasanya tidak mampu mengeluarkan urea sehingga mengakibatkan tingginya kandungan urea dalam darah [11]. Jadi penentuan atau analisis urea dalam cairan tubuh seperti darah sangat diperlukan untuk keperluan diagnosa.

Metode penentuan urea biasanya dilakukan berdasarkan metode kolorimetri atau reaksi enzim secara tidak langsung. Sebagai contoh, reaksi antara urea dengan diasetilmonoksim memberikan warna kuning yang nilai absorbansinya dapat diukur secara spektrofotometri. Penentuan urea secara tidak langsung berdasarkan pada reaksi antara urea dan urease yang menghasilkan amoniak yang dapat ditentukan secara elektrokimia atau secara kolorimetri [18]. Penentuan secara langsung dengan metode spektrofotometri kurang baik karena kurang begitu mengikuti kaidah Lambert & Beer sehingga mengurangi nilai kwantitatif. Penentuan urea akan lebih teliti bila menggunakan enzim sebagai pereaksi karena sifatnya yang spesifik [12].

Alat sensor dengan karakteristik selektifitas tinggi, spesifik dan respon yang cepat sangat diperlukan untuk keperluan klinis untuk memudahkan prosedur analisis dan miniaturisasi bentuk sensor akan menguntungkan baik dari segi kepraktisan maupun pertimbangan komersial. Untuk memenuhi kebutuhan akan sensor mini, beberapa peneliti mengusulkan penggunaan elektroda kawat sebagai transduser biosensor [1,2,5]. Untuk itu penelitian yang intensif tentang penggunaan elektroda kawat terus dilakukan dalam rangka pengembangan sensor dengan ukuran mini. Penggunaan elektroda kawat sebagai transduser menguntungkan karena kuat, mudah pembuatannya serta memungkinkan dibuat dalam bentuk mini. Beberapa elektroda kawat logam telah diketahui dapat digunakan sebagai transduser yang dikombinasi dengan enzim [13-15].

Reaksi antara urea dan urease menghasilkan amonia dan karbon dioksida. Hasil reaksi ini dapat mengubah pH larutan dimana reaksi tersebut terjadi. Penentuan urea dalam suatu larutan dapat dilakukan dengan cara mengukur perubahan pH larutan karena perubahan pH tersebut sebanding dengan log konsentrasi urea. Untuk mengukur perubahan pH larutan ini biasanya digunakan elektroda pH. Akan tetapi telah diketahui bahwa elektroda kawat tungsten juga dapat digunakan untuk menentukan pH suatu larutan seperti logam antimon [16]. Penggunaan tungsten sebagai alat penentuan pH cukup menguntungkan dalam pembuatan sensor karena mudah diperoleh, tersedia dalam bentuk kawat kecil dan harganya cukup murah.

PERCOBAAN

Alat dan Bahan

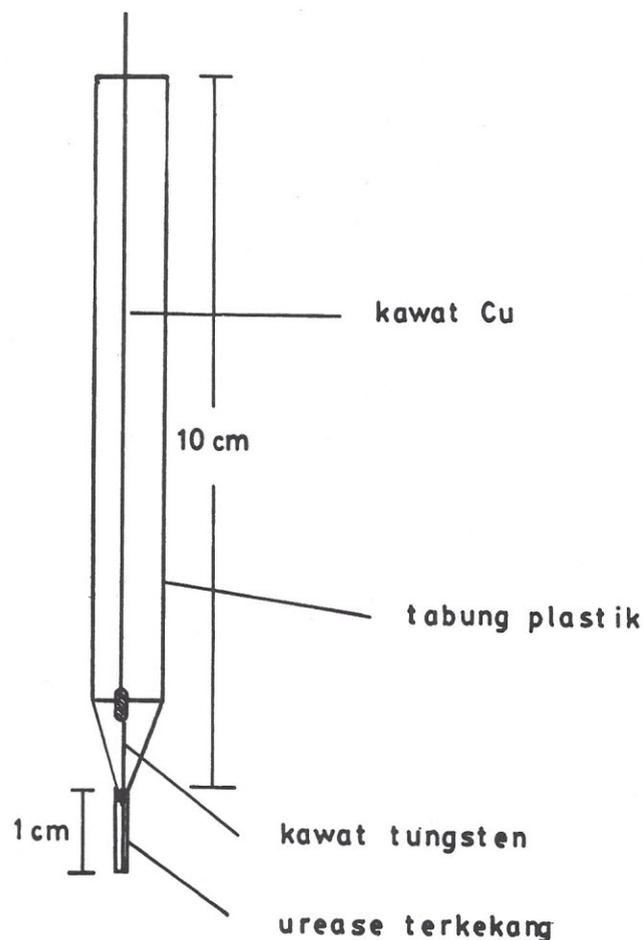
Untuk pengukuran potensial listerik digunakan Activon 205 Digital pH/ mV meter.
Kawat tungsten (GoodFellow) dengan diameter 1 mm.
Elektroda Kalomel Jenuh (EKJ) sebagai elektroda pembanding.
Urease (Sigma Chemical Co., Type IX, 66.000 IU/ gram)
Polyvinylchloride (PVC)

Pembuatan Sensor Urea

Dengan mengkombinasi komposisi dan jumlah pelapisan, pada percobaan ini dibuat 3 jenis sensor ;
Sensor A. Kawat tungsten dicelup pada larutan polimer dengan komposisi 10 mg PVC dalam 1,5 ml tetrahydrofuran (THF) yang mengandung 200 mg urease. Pencelupan dilakukan sebanyak 5 kali.
Sensor B. Kawat tungsten dicelup pada larutan polimer diatas sebanyak satu kali.

Sensor C. Kawat tungsten dicelup pada larutan polimer dengan komposisi 10 mg PVC dalam 1,5 ml THF yang mengandung 100 mg urease. Pencelupan dilakukan sebanyak lima kali.

Secara skematis, sensor urea diperlihatkan pada Gambar 1. Sensor tersebut dicelup dalam larutan trizmabase (pH 7) selama



Gambar 1. Gambar skematis biosensor.

satu jam sebelum digunakan. Bila tidak digunakan, sensor disimpan dalam lemari es dalam keadaan kering.

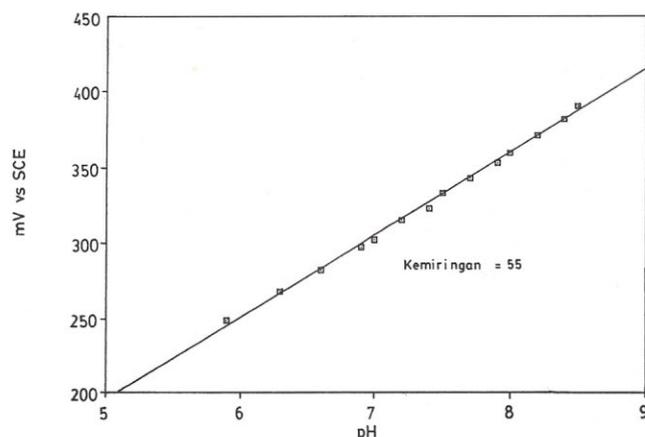
Untuk pengukuran beda potensial, sensor dan EKJ dicelupkan pada larutan urea (± 10 ml) dalam gelas kimia 25 ml. Pengukuran beda potensial dimonitor dan direkam dengan menggunakan sebuah pencatat.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Respon tungsten terhadap pH

Respon tungsten terhadap pH telah dicoba dan hasilnya diperlihatkan pada Gambar 2. Terlihat bahwa respon yang diperoleh hampir linier pada rentang pH 5 - 9 dengan kemiringan 55 mV per satuan pH. Hasil tersebut sesuai dengan apa yang telah diperoleh oleh Britton dan kawan-kawan [18] yang juga mencoba menggunakan tungsten sebagai elektroda pH.

Pada percobaan ini, tungsten digunakan untuk mendeteksi perubahan pH yang dihasilkan dari hidrolisa enzimatik urea oleh urease.



Gambar 2. Respon tungsten terhadap pH.

Kalibrasi

Sensor urea yang dibuat pada percobaan ini digunakan untuk mendeteksi perubahan pH didalam larutan substrat sebagai hasil hidrolisis urea oleh urease pada permukaan sensor. Seperti halnya sensor yang lain, potensial listerik yang timbul pada permukaan elektroda berhubungan dengan kandungan ion hidrogen dalam larutan. Hal ini dapat digambarkan pada persamaan berikut :

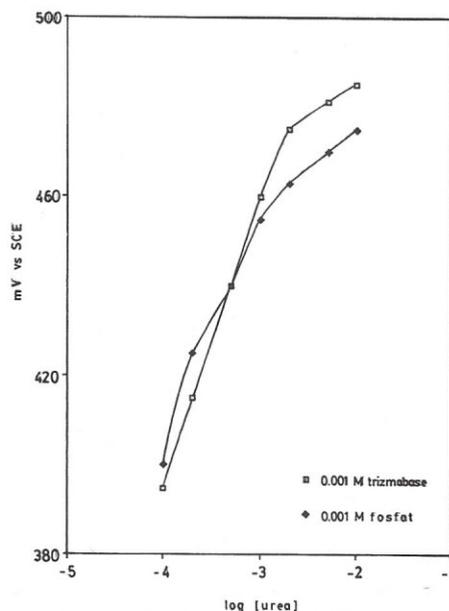
$$E = E_0 + (RT/F) \ln a_{H^+} \quad \text{atau}$$

$$E = E_0 + (RT/F) \ln [\text{urea}]$$

dimana :

- E_0 = potensial standar
- R = konstanta gas
- F = bilangan Faraday
- a_{H^+} = keaktifan ion hidrogen

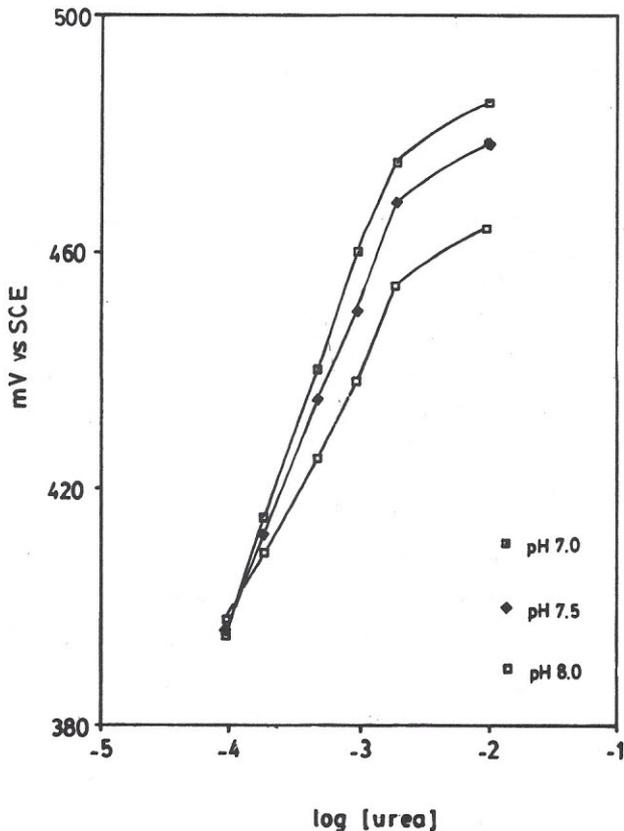
Secara ideal, persamaan diatas akan memberikan harga kemiringan sebesar 59 mV apabila $\log [\text{urea}]$ dialurkan terhadap potensial, E . Dari hasil percobaan diperoleh bahwa respon dari sensor tersebut tidak sepenuhnya mengikuti persamaan Nernst. Gambar 3. memperlihatkan kemiringan kurva yang diperoleh



Gambar 3. Kurva kalibrasi yang diperoleh dari hasil pengukuran dalam 2 lingkungan bufer.

dari hasil pengukuran pada dua jenis bufer. Harga yang diperoleh bila menggunakan bufer fosfat adalah 48 mV, sedangkan bila menggunakan bufer trizmabase adalah 52 mV. Nilai ini lebih mendekati nilai teoritis, 59 mV. Lebih kecilnya harga kemiringan yang diperoleh dibandingkan dengan harga teoritis dapat disebabkan karena tidak semua hasil reaksi dapat mencapai permukaan sensor [19].

Dari hasil percobaan juga diperoleh bahwa jenis dan konsentrasi bufer mempengaruhi harga kemiringan kurva kalibrasi. Selain itu, kemiringan kurva kalibrasi juga dipengaruhi oleh harga pH bufer yang digunakan. Gambar 4. menunjukkan pengaruh pH bufer terhadap kurva kalibrasi. Pada pH 7,0 dan 7,5 harga kemiringan yang diperoleh hampir sama, sedangkan pada nilai pH



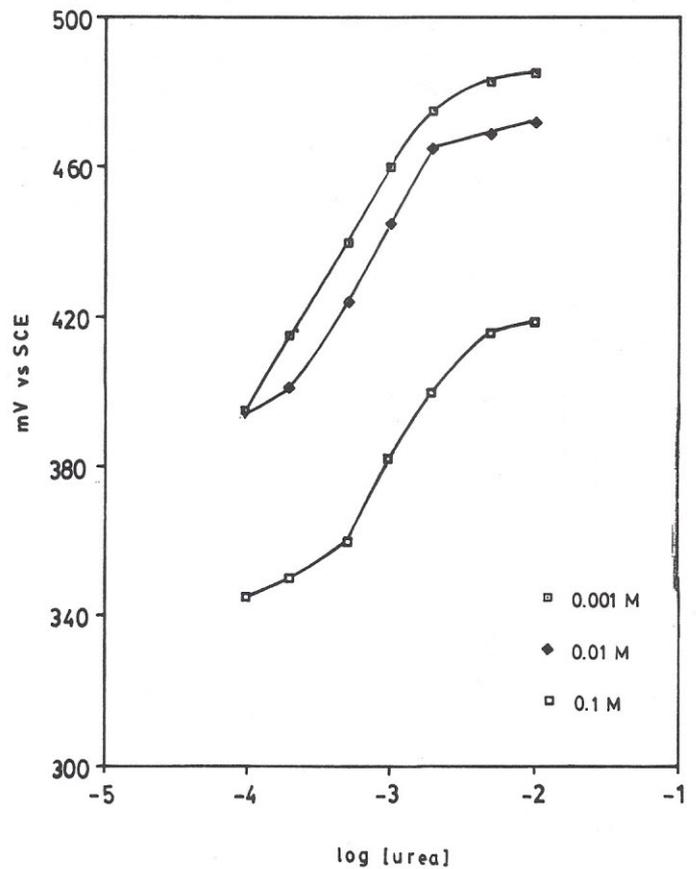
Gambar 4. Pengaruh pH bufer terhadap kurva kalibrasi.

yang lebih tinggi, pH 8,0, harga kemiringan menurun. Hal ini dapat disebabkan karena turunnya kepekaan sensor yang diakibatkan oleh turunnya aktivitas enzim pada harga kondisi pH diatas kondisi optimumnya [20].

Dalam percobaan ini sensor urea diuji responnya pada konsentrasi bufer yang berlainan, seperti diperlihatkan pada Gambar 5. Hasil percobaan menunjukkan bahwa konsentrasi bufer mempengaruhi respon sensor terhadap urea. Dengan naiknya konsentrasi bufer harga potensial yang diperoleh bergeser ke arah daerah yang kurang positif. Hal ini menunjukkan bahwa konsentrasi bufer yang tinggi dapat menurunkan aktivitas enzim sehingga berakibat menurunnya kepekaan dari sensor.

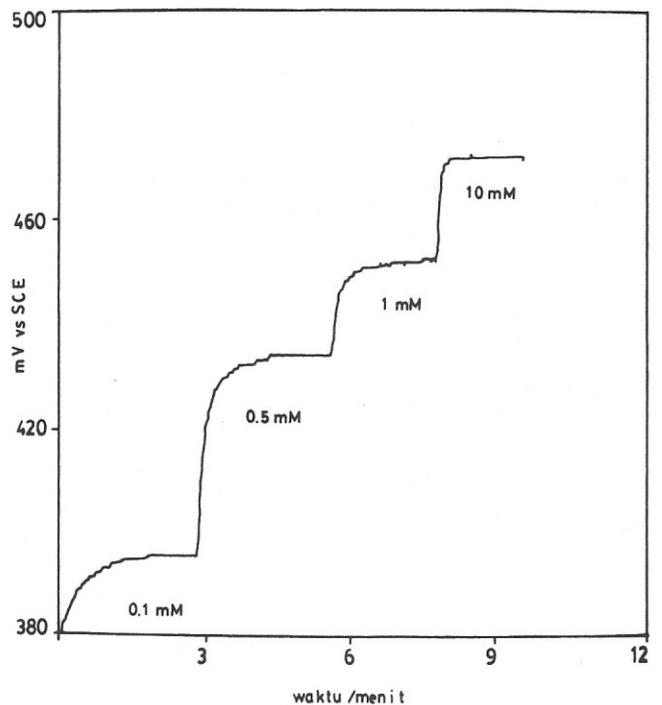
Waktu Respon

Waktu respon dari sebuah sensor didefinisikan sebagai waktu yang diperlukan oleh suatu sensor untuk memberikan sinyal fisik sampai diperoleh harga yang konstan. Waktu respon dari sensor

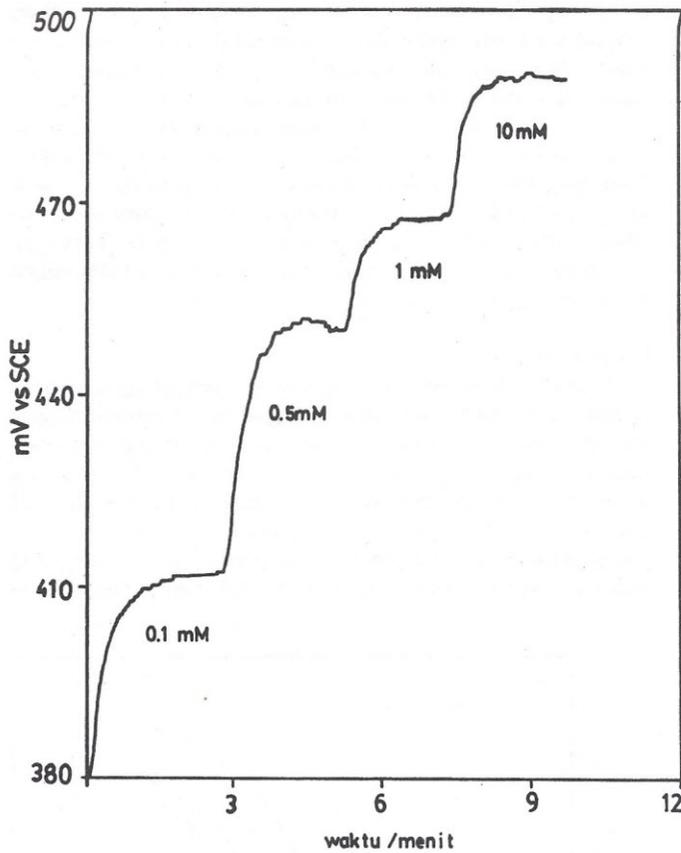


Gambar 5. Respon sensor terhadap urea pada berbagai konsentrasi bufer trizmabase pada pH 7,0

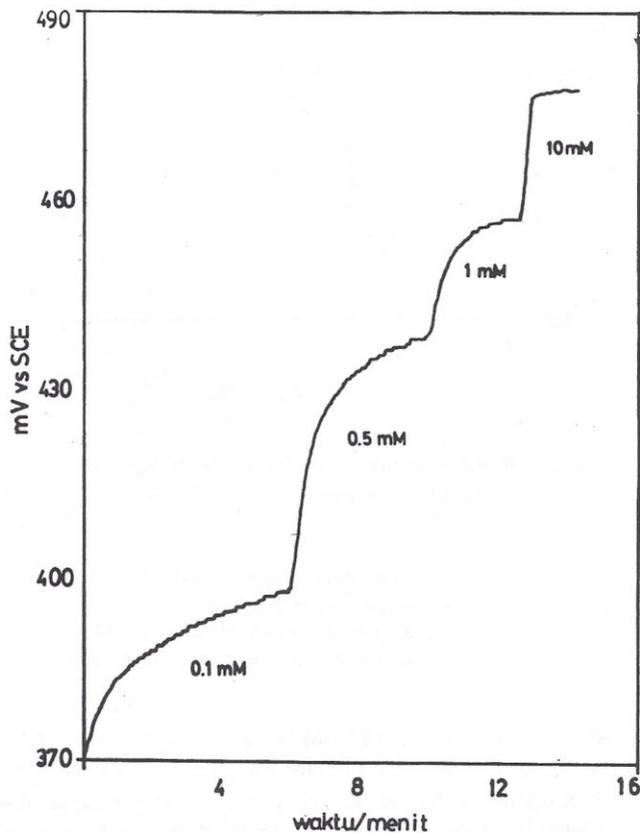
urea diuji terhadap urea yang dilarutkan dalam bufer trizmabase 0,001 M, pH 7,0. Gambar 6, 7 dan 8 memperlihatkan waktu



Gambar 6. Waktu respon yang diperoleh dari sensor A.



Gambar 7. Waktu respon yang diperoleh dari sensor B.



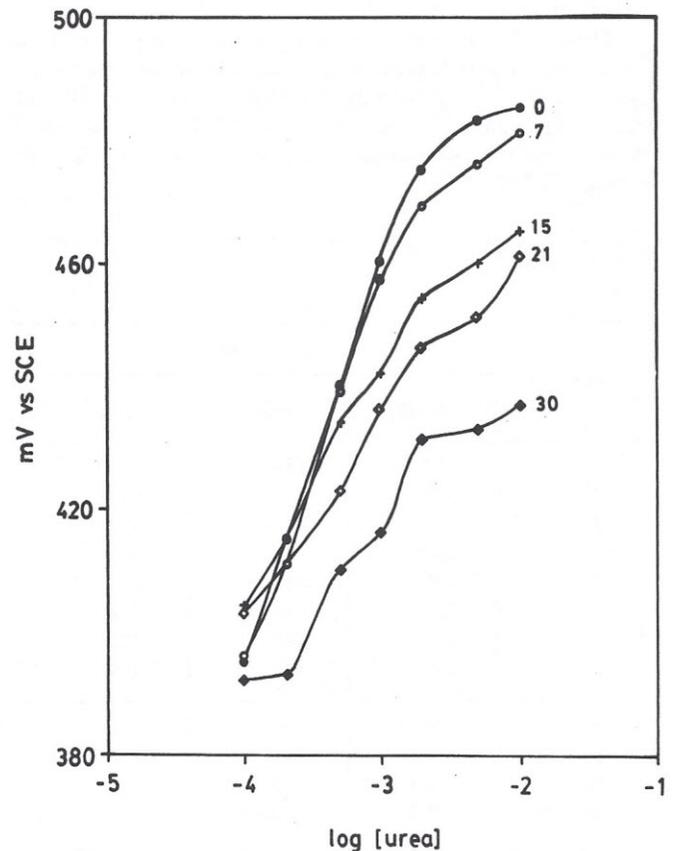
Gambar 8. Waktu respon yang diperoleh dari sensor C.

respon dari sensor A, B dan C. Kurva waktu respon menunjukkan perbedaan sifat respon dari masing-masing sensor terhadap berbagai konsentrasi urea. Jadi, sifat respon dari sensor yang dibuat dari kombinasi enzim dan suatu transduser dipengaruhi oleh berbagai faktor seperti; komposisi membran, ketebalan membran, konsentrasi substrat dan pH dari larutan substrat [21].

Seperti diperlihatkan oleh Gambar 6, sensor A memberikan waktu respon yang cukup singkat. Keadaan konstan dicapai dalam waktu sekitar satu menit. Pengukuran potensial dilakukan mulai dari konsentrasi urea yang rendah sampai yang tinggi. Sensor B, seperti diperlihatkan pada Gambar 7 memberikan waktu respon yang lebih lama dibanding sensor A. Dari ke tiga sensor yang dibuat, sensor C memberikan waktu respon yang paling lama, dimana keadaan konstan dicapai setelah waktu lebih dari 4 menit. Waktu respon dari sensor B yang lebih lambat dibanding sensor A dapat disebabkan oleh kecilnya kandungan enzim pada lapisan membran. Waktu respon yang cukup lama yang diberikan oleh sensor C dapat disebabkan oleh konstruksi sensor itu sendiri yaitu lapisan membran cukup tebal sedangkan kandungan enzimnya sedikit.

Stabilitas

Stabilitas dari suatu biosensor didefinisikan sebagai waktu yang diperlukan oleh sensor hingga habisnya kepekaan dari sensor tersebut untuk merespon substrat setelah digunakan untuk sejumlah pengukuran. Pengaruh ini ditunjukkan oleh penurunan kemiringan kurva kalibrasi dari waktu ke waktu. Gambar 9 menunjukkan penurunan kepekaan sensor A setelah penggunaan



Gambar 9. Kurva stabilitas sensor A.
 • hari pembuatan ◊ hari ke-21
 ○ hari ke-7 ◆ hari ke-30
 + hari ke-15

beberapa hari. Pada 15 hari pertama kemiringan kurva terlihat hampir konstan, akan tetapi mulai menurun setelah itu sampai hari ke 30.

Telah diketahui bahwa stabilitas dari suatu biosensor bergantung kepada beberapa faktor seperti (1) jenis teknik amobilisasi yang dipakai, (2) jumlah enzim dalam lapisan polimer dan (3) kondisi operasi. Kestabilan suatu elektroda enzim dimana amobilisasi enzimnya dilakukan secara fisik biasanya berakhir dalam selang waktu 3-4 minggu [22], dan untuk yang amobilisasinya dilakukan secara kimia, kestabilan sensor dapat bertahan lebih lama, sekitar 3-4 bulan.

Cara penyimpanan biosensor atau elektroda enzim juga dapat mempengaruhi kestabilannya [23]. Sangat dianjurkan agar penyimpanan elektroda enzim dilakukan dalam sebuah lemari pendingin untuk mencegah aktivitas bakteri yang cenderung merusak aktivitas enzim. Kondisi operasi dapat pula mempengaruhi kestabilan suatu elektroda enzim. Sebagai contoh, pH 7 adalah merupakan kondisi optimum bagi reaksi antara urea dan urease karena pada pH yang lebih rendah dari 6 atau lebih besar dari 8 akan mengurangi aktivitas enzim seperti yang telah diperoleh oleh Jagner et al. [24].

Penurunan kestabilan suatu biosensor dapat pula disebabkan oleh terkikisnya enzim dari lapisan membran pada waktu penggunaan. Pengadukan larutan substrat selama pengukuran potensial listerik akan sangat mendorong pengikisan enzim dari lapisan membran. Selain terkikisnya enzim dari lapisan membran, lepasnya kofaktor yang terikat lemah pada daerah aktif enzim dapat menurunkan kestabilan suatu elektroda enzim.

Kebolehlulangan

Kebolehlulangan dari sensor yang dibuat pada percobaan ini telah dicoba. Untuk keperluan ini digunakan larutan urea dengan tiga konsentrasi yang berbeda, 0,1 mM, 1,0 mM dan 10 mM. Hasil pengukuran ini diperlihatkan pada Tabel 1. Standar deviasi relatif (%RSD) untuk masing-masing konsentrasi urea diperoleh kurang dari 5%.

Tabel 1. Kebolehlulangan sensor pada berbagai konsentrasi urea.

| No. | mV vs SCE | | |
|-----------|-----------|------|--------|
| | 10 mM | 1 mM | 0,1 mM |
| 1 | 475 | 440 | 415 |
| 2 | 478 | 440 | 414 |
| 3 | 483 | 446 | 412 |
| 4 | 480 | 441 | 420 |
| 5 | 482 | 443 | 417 |
| 6 | 480 | 444 | 414 |
| 7 | 481 | 442 | 420 |
| 8 | 480 | 440 | 419 |
| n | 8 | 8 | 8 |
| Rata-rata | 479,9 | 442 | 416,4 |
| SD | 2,4 | 2,2 | 6,0 |
| RSD (%) | 0,5 | 0,49 | 1,44 |

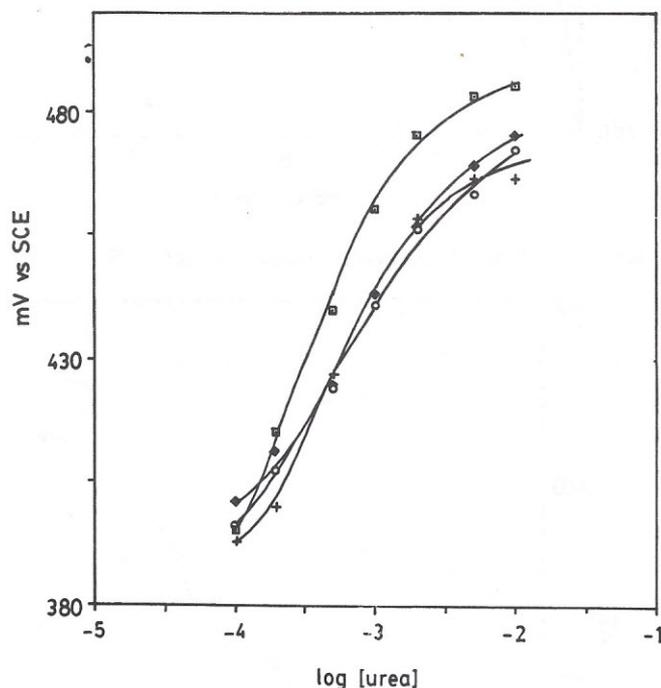
Waktu cuci

Pada penentuan urea dalam suatu larutan dengan menggunakan sensor urea, terjadi proses hidrolisis enzimatik antara urea dan

urease pada permukaan sensor. Agar terjadi reaksi tersebut, substrat harus bermigrasi dari larutan induk menuju permukaan sensor. Akan tetapi migrasi spesi lain yang ada dalam larutan induk tidak dapat dihindari, bahkan dapat menerobos lapisan membran yang mungkin akan menghalangi migrasi substrat. Untuk memelihara penampilan sensor pada saat digunakan, dianjurkan untuk melakukan pencucian atau pembilasan sensor setiap kali sesudah pemakaian. Waktu cuci dari sensor urea yang dibuat pada percobaan ini adalah sekitar 5 menit. Pencucian dilakukan dengan cara mencelupkan sensor dalam akuades sambil diaduk secara perlahan-lahan.

Ion pengganggu

Untuk menguji adanya pengaruh ion pengganggu terhadap respon dari sensor, dilakukan pengukuran potensial dengan adanya senyawa-senyawa lain dalam larutan substrat. Senyawa-senyawa yang ditambahkan adalah spesi yang biasa terdapat dalam darah. Komponen apa saja yang dapat mengubah pH larutan cuplikan sangat mungkin akan mengurangi ketelitian penentuan urea dalam cuplikan. Hasil percobaan ini ditunjukkan pada Gambar 10. Materi yang ditambahkan untuk pengujian ini



Gambar 10. Kurva kalibrasi untuk urea dalam berbagai lingkungan kimia.

- dalam bufer trizabase 0,001 M pH 7,0
- ♦ dalam garam fisiologi
- dengan adanya asam urat 0,2 mM
- + dengan adanya vitamin C 0,005 mM

adalah; garam fisiologi (97 mM NaCl, 58 mM Na-asetat, 3,5 mM CaCl₂, 1,5 mM KCl dan 0,5 mM MgCl₂), asam urat dan vitamin C. Konsentrasi dari materi yang ditambahkan tersebut dibuat sedemikian rupa sehingga mendekati konsentrasi yang biasa terdapat di dalam darah. Hasil percobaan menunjukkan bahwa

adanya materi tersebut tidak mengubah kemiringan kurva kalibrasi akan tetapi menggeser nilai potensial sedikit ke daerah yang kurang positif. Dari hasil tersebut dapat dikatakan bahwa penampilan sensor urea tersebut cukup selektif untuk penentuan urea dalam larutan cuplikan.

Penampilan suatu sensor yang digunakan untuk penentuan suatu analit dapat pula bergantung pada sifat dari transduser yang digunakan. Transduser yang digunakan untuk pembuatan sensor urea pada percobaan ini adalah kawat tungsten. Dilihat dari sifat fisik dan kimia, logam tersebut cukup baik apabila digunakan sebagai transduser pada biosensor untuk urea. Telah diketahui bahwa tungsten sangat tahan terhadap banyak senyawa kimia [25]. Pada temperatur kamar tungsten hanya bereaksi dengan gas fluor dan dengan campuran asam nitrat dan asam fluorida. Akuatregia, kaustik soda bersama dengan oksidator seperti hidrogen peroksida dapat melarutkan tungsten di sekitar suhu 100° C. Reaksi tungsten dengan senyawa lain seperti amoniak, karbon disulfida, sulfur dioksida hanya dapat terjadi pada suhu 250° C. Telah diketahui pula bahwa pada temperatur kamar tungsten sangat peka terhadap perubahan PH [17]. Dari data tersebut, tungsten merupakan materi potensial untuk digunakan sebagai transduser dalam pembuatan biosensor yang mekanisme deteksinya berdasarkan pada perubahan pH.

Sensor yang dikembangkan dalam percobaan ini memberikan penampilan yang baik, seperti linieritas, kebolehlungan dan kestabilan. Bagaimanapun aktifitas enzim urease sendiri diketahui sangat dipengaruhi oleh beberapa ion logam berat seperti; perak, raksa, tembaga, seng, kadmium, uranium, emas, timbal, kobal, nikel dan serium [26]. Akan tetapi, jenis logam berat tersebut di atas sangat jarang ditemukan di dalam cairan tubuh manusia. Dengan demikian sensor urea ini cukup sensitif untuk digunakan sebagai alat untuk analisis urea dalam cairan tubuh, seperti darah atau urin.

Penentuan urea dalam serum

Kandungan urea dalam serum normal bergantung pada jenis kelamin dan usia. Pada umumnya pria memiliki kandungan urea dalam darahnya lebih tinggi dibanding wanita [27], dan rentang konsentrasinya adalah 19-51 mg/dL pada pria dan 16,2-43,8 mg/dL pada wanita. Untuk menguji sensor urea yang dibuat pada percobaan ini, digunakan 2 cuplikan standar yaitu, serum kontrol. Yang pertama disebut sebagai Type I-A, Normal, dengan konsentrasi urea 17,1-25,7 mg/dL, sedangkan yang lain disebut Type II-A, Elevated, yang kandungan ureanya adalah 102,9-120 mg/dL seperti tertulis pada labelnya masing-masing. Sebelum digunakan, cuplikan tersebut harus diencerkan terlebih dahulu sesuai dengan petunjuk yang diberikan oleh perusahaan pembuat. Dalam hal ini, pengenceran 2 X dilakukan untuk sampel Normal dan 20 X untuk yang Elevated. Pengukuran potensial dilakukan 8 kali untuk tiap cuplikan.

Hasil analisis urea diperlihatkan pada Tabel 2. Diperoleh bahwa hasil rata-rata adalah 16,95 mg/dL untuk yang Normal dan 115,41 mg/dL untuk yang Elevated. Standar deviasi relatif (%RSD) yang diperoleh adalah 4,0 % untuk yang Elevated dan 5,9 % untuk yang Normal.

Hasil rata-rata yang diperoleh untuk cuplikan Normal lebih rendah dibanding harga yang tertulis pada label, sedangkan untuk cuplikan Elevated diperoleh nilai rata-rata yang berada di dalam rentang konsentrasi pada label. Nilai RSD yang lebih dari 5 % untuk cuplikan Normal dapat disebabkan karena terlalu rendahnya kandungan urea dibanding dengan yang Elevated.

Tabel 2. Hasil analisis urea dari serum kontrol

| No. | Serum Kontrol | |
|-----------|---------------|------------------|
| | Normal(mg/dL) | Elevated (mg/dL) |
| 1 | 17,4 | 120,0 |
| 2 | 15,6 | 114,3 |
| 3 | 15,6 | 122,0 |
| 4 | 17,4 | 111,5 |
| 5 | 18,0 | 114,3 |
| 6 | 18,0 | 110,6 |
| 7 | 16,2 | 120,0 |
| 8 | 17,4 | 110,6 |
| Rata-rata | 16,95 | 115,41 |
| SD | 1,00 | 4,62 |
| RSD (%) | 5,91 | 4,0 |

Tabel 3. Perbandingan hasil analisa urea dalam serum kontrol.

| Cuplikan | Pabrik (mg/dL) | Sensor urea (mg/dL) |
|---------------------|----------------|---------------------|
| Type I-A, Normal | 17,1 – 25,7 | 16,95 |
| Type II-A, Elevated | 102,9 – 120,0 | 115,41 |

KESIMPULAN

Pada percobaan ini ditunjukkan suatu biosensor untuk urea dengan respon yang cepat dan dengan bentuk yang cukup kecil dapat dibuat dengan menggabungkan enzim urease yang diamobilisasi secara fisik dalam PVC dan elektroda logam tungsten yang berdiameter 1 mm. Sensor ini mampu menganalisis urea dalam larutan cuplikan yang berrentang konsentrasi 0,1-10 mM. Respon sensor terhadap urea pada pH 7 memberikan kemiringan sebesar 52 mV. Penurunan harga kemiringan ditemukan bila konsentrasi bufer bertambah besar atau bila harga pH bufer lebih besar dari 7.

Dibanding sensor atau sistem elektroda lain untuk analisis urea, sensor ini cukup baik penampilannya. Sensor ini memberikan waktu respon cepat, antara 0,5-2 menit per analisis, cukup teliti dan mudah dioperasikan. Selain itu, sensor ini cocok untuk menganalisis urea dalam volume cuplikan yang sedikit.

Metode amobilisasi seperti yang dilakukan, yaitu *entrapment* enzim dalam PVC, cukup baik, dan bila dikombinasikan dengan elektroda tungsten, dapat digunakan untuk menganalisis urea dengan cukup teliti. Lebih dari itu, sensor ini cukup murah dan mudah dibuat. Kestabilan sensor ini setelah digunakan untuk sejumlah penentuan berkurang setelah 30 hari.

Dari hasil percobaan diatas, terbuka kemungkinan untuk lebih menyempurnakannya lagi atau bahkan mengembangkan model yang lain seperti *strip-type disposable sensor*.

PUSTAKA

1. P.W. Alexander and J.P. Joseph, A Coated-Metal Enzyme Electrode For Urea Determinations. *Anal. Chim. Acta.*, 131: 103-109 (1981)

2. R.M. Ianniello and A.M. Yacynych. Urea Sensors Based on Iridium Dioxide Electrodes with Immobilized Urease. *Anal. Chim. Acta.*, 146 : 249-253 (1983) 146(1983)249
3. J.P. Joseph, *Mikro. Chim. Acta.*, II(1984)473
4. J.P. Joseph, *Anal. Chim. Acta.*, 109(1985)249
5. H.M. Abdulla, G.M. Greenway and A.E. Platt, *Analyst.*, 1154(1989)1575
6. M. Przybyt and H. Sugier. Metal-metal oxide enzyme electrodes for the determination of urea. *Anal. Chim. Acta.*, 237 : 399-404 (1990)
7. M. Przybyt and H. Sugier, *Anal. Chim. Acta.*, 239(1990)269
8. G.G. Guilbault and J.G. Montalvo. An Enzyme Electrode for the substrate of urea. *J. Amer. Chem. Soc.*, 92 : 2533-2538 (1970)
9. G.G. Guilbault and G. Nagy, Improved Urea Electrode. *Anal. Chem.*, 45:417-419 (1973)
10. G.G. Guilbault and M. Tarp. A Specific Enzyme Electrode for Urea. *Anal. Chim. Acta.*, 73 : 355-365 (1974)
11. "CRC Handbook of Clinical Laboratory Data", The Chemical Rubber Company Press, Cleveland, Ohio, 1968, p. 356
12. R.J. Henry, *Clinical Chemistry: Principle and Techniques*, Harper and Row, New York, 1964, p. 262
13. P. Schulthess, Y. Shijo, H.V. Pham, E. Pretsch, D. Ammann, and W. Simon. A Hydrogen Ion-Selective liquid-membrane electrode based on tri-n-dodecyl amine as neutral carrier. *Anal. Chim. Acta.*, 131:111-122(1981)
14. D. Ammann, F. Lanter, R.A. Steiner, P. Schulthess, Y. Shijo and W. Simon. Neutral carrier based on hydrogen ion selective microelectrode for extra and intra cellular studies. *Anal. Chem.*, 53:2267-2269 (1981)
15. T. Satchwill and D.J. Harrison, *J. Electroanal. Chem.*, 202(1986)75
16. E.J. Roberts and F. Fenwick. The antimony-antimony trioxide electrode and its use as a measures of acidity. *J. Am. Chem. Soc.*, 50:2125-2147(1928)
17. H.C. Parker. Potentiometric hydrogen-ion measurements with non-gas electrodes. *Ind. Eng. Chem.*, 17: 737-740(1925)
18. H.T.S. Britton and E.N. Dodd. The use of the tungsten electrode in potentiometric titrations and pH measurements. *J. Chem. Soc.*, 829-836 (1931)
19. W.J. Blaedel, T.R. Kissel and R.C. Boguslaski. Kinetic behaviour of enzymes immobilized in artificial membranes. *Anal. Chem.* 44: 2030-2037 (1972)
20. A.L. Lechninger, *Biochemistry*, Worth, New York, 1970, p. 51
21. J. Wang, *Electroanalytical Techniques in Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 1988, p. 82
22. G.G. Guilbault, *App. Biochem. Biotech.*, 7(1982)85-89
23. G.G. Guilbault, *Analytical Uses of Immobilized Enzyme*, 1984, p. 139
24. T. Anfalt, A. Granelli and D. Jagner, *Anal. Lett.*, 6(1973)969
25. G.D. Rieck, *Tungsten and Its Compounds*, Pergamon Press, London, 1967, p. 35
26. E.G. Schmidt. The inactivation of urease. *J. Biol. Chem.*, 78: 240-252 (1946)
27. A. M. Bold and P. Wilding, *Clinical Chemistry*, Blackwell Scientific Publications, 1975, p. 35