

Pengembangan Biosensor Berbasis Kertas untuk Penentuan Aktivitas Antihiperlipidemia pada Sampel Ekstrak Tanaman (Development of Paper-Based Biosensor for Screening of Antihyperlipidemia Activities on Herbal Extracts)

Vinda Aisya Vira, Bambang Kuswandi, Indah Purnama Sary
Fakultas Farmasi, Universitas Jember
Jln. Kalimantan 37, Kampus Tegal Boto Jember 68121
e-mail korespondensi: vindavira9a@gmail.com

Abstract

A biosensor is an alternative method to determine the antihyperlipidemic activity to be more simple, effective, and efficient in various herbal extracts. This study aimed to develop a biosensor with the principle of pancreatic lipase enzyme inhibition in paper microzone plates using Whatman filter paper for the matrix, 200 unit/mL of lipase enzyme solution, 1% extract, and 80 mM p-NPB substrate. This paper-based biosensor method shows results that fulfilled the several characterizations, that are the 30 min of the incubation time; linearity using 7 standards orlistat concentrations of 5-35 mg/mL with the regression equation of $Y = 22.09585 + 2.170514X$, correlation coefficient value (r) = 0.9996745, $V_{x0} = 1.509906\%$, $X_p = 1.572533$ mg/mL; LOD and LOQ are 1,573 mg/mL and 4,718 mg/mL; precision with RSD value of 2.545%; accuracy with % recovery value of 99.222%; biosensor usage time after storage remained stable for 3 days at chiller temperatures and for 45 minutes at room temperature. The paper-based biosensor can be an alternative method for detecting antihyperlipidemic activity in plant extracts as same as UV-Vis spectrophotometry method.

Keywords: Antihyperlipidemia, Biosensor, Plant Extracts, Lipase

Abstrak

Biosensor merupakan metode alternatif untuk menentukan aktivitas antihiperlipidemia secara lebih efektif dan efisien pada berbagai ekstrak tanaman obat. Penelitian ini dilakukan dengan tujuan untuk mengembangkan biosensor dengan prinsip inhibisi ezim lipase pankreas pada lempeng kertas zona mikro dengan menggunakan media kertas saring *Whatman* dan larutan enzim lipase 200 Unit/ml, ekstrak 1%, dan substrat p-NPB konsentrasi 80 Mm. Metode biosensor berbasis kertas ini menunjukkan hasil yang memenuhi beberapa karakterisasi, yaitu waktu inkubasi substrat selama 30 menit; linieritas dari 7 konsentrasi standar orlistat 5-35 mg/mL dengan persamaan regresi $Y = 22,09585 + 2,170514X$, nilai koefisien korelasi (r) = 0,9996745, nilai $V_{x0} = 1,509906\%$, dan nilai $X_p = 1,572533$ mg/mL; LOD pada konsentrasi 1,573 mg/mL dan LOD pada konsentrasi 4,718 mg/mL; presisi dengan nilai RSD sebesar 2,545%; akurasi dengan nilai % *recovery* sebesar 99,222%; waktu pakai biosensor setelah penyimpanan tetap stabil selama 3 hari pada suhu *chiller* 2-4°C dan selama 45 menit pada suhu ruangan $\pm 25^\circ\text{C}$. Biosensor berbasis kertas dapat menjadi metode alternatif untuk deteksi aktivitas antihiperlipidemia pada ekstrak tanaman karena memberikan hasil analisis yang tidak berbeda signifikan dengan metode spektrofotometri UV-Vis.

Kata kunci: Antihiperlipidemia, Biosensor, Ekstrak Tanaman, Lipase

Pendahuluan

Hiperlipidemia merupakan kondisi abnormal pada lipid dalam darah berupa peningkatan kadar kolesterol dan/atau trigliserida [1]. Tanaman obat sering dipakai sebagai pengobatan alternatif penyakit hiperlipidemia karena memiliki efek samping merugikan yang lebih kecil [2], sehingga sebagai upaya dalam pencarian senyawa dengan aktivitas antihiperlipidemia alami, maka perlu dilakukan pengujian aktivitas antihiperlipidemia pada berbagai tanaman obat.

Prinsip penghambatan aktivitas enzim lipase merupakan salah satu contoh pengujian secara *in vitro*. Pengujian ini dapat dilakukan dengan berbagai metode instrumentasi, diantaranya yaitu menggunakan *High Performance Liquid Chromatography-Diode Array Detection Mass Spectroscopy* (HPLC-DAD-MS) [3], Kromatografi Lapis Tipis bioautografi [4], dan Spektrofotometri UV-Vis [5]. Metode instrumentasi tersebut memiliki beberapa kelemahan, yaitu membutuhkan laboratorium atau tempat kerja khusus dan tenaga profesional untuk mengoperasikannya, proses analisis yang panjang dan biaya yang dikeluarkan juga lebih besar.

Penelitian ini dilakukan dengan tujuan untuk mengembangkan biosensor aktivitas antihiperlipidemia sebagai metode alternatif untuk menentukan aktivitas anti-hiperlipidemia pada ekstrak tanaman dengan prinsip inhibisi enzim lipase pankreas pada lempeng kertas zona mikro (*Paper Microzone Plates*) menggunakan kertas saring *Whatman*. Substrat p-NPB (p-Nitrofenil Butirat) ditambahkan untuk menghasilkan produk dari reaksi hidrolisis yaitu p-Nitrofenol yang akan menjadi indikator perubahan warna. Sampel yang digunakan berupa serbuk tanaman dari Materia Medika yang memiliki aktivitas antihiperkolesterolemia berdasarkan formula saintifikasi jamu. Penelitian ini diharapkan dapat menghasilkan suatu metode alternatif untuk penentuan aktivitas antihiperlipidemia dalam berbagai sampel ekstrak tanaman obat yang lebih praktis dan

mudah namun memiliki sensitivitas spesifisitas yang tinggi.

Metode Penelitian

Alat

Neraca analitik, pH meter, oven, *ultrasonic degasser*, spektrofotometer UV-Vis (Hitachi U-1800), *stopwatch*, *scanner* (*Canon LiDE 120*), *software ImageJ*, *ball filler*, mikropipet, pipet volume, kertas saring *Whatman*, batang pengaduk, kuvet, dan seperangkat alat gelas.

Bahan

Lipase pankreas (SIGMA L3126), p-Nitrofenil Butirat (SIGMA N9876), Orlistat (SIGMA), *Tris(hydroxymethyl)amino-methane* (SIGMA 252859), HCl 1,0 N (Merck), metanol p.a. (Merck), asetonitril (Merck), akuades steril, beberapa serbuk tanaman dari Materia Medika Batu berdasarkan formula ramuan jamu untuk hiperkolesterolemia yaitu daun jati belanda (*Guazuma ulmifolia* Lamk.); daun jati cina (*Cassia angustifolia* Vahl.); herba tempuyung (*Sonchus arvensis* Linn.); rimpang kunyit (*Curcuma longa* Linn.); daun teh hijau (*Camellia sinensis* Linn.); herba temulawak (*Curcuma xanthorrhiza* Roxb.); dan herba meniran (*Phyllanthus niruri* Linn.) [6].

Prosedur Pengukuran

Pembuatan Larutan Buffer Tris-HCl

Larutan buffer Tris-HCl dibuat dengan melarutkan *Tris(hydroxymethyl)amino-methane* sebanyak 12,114 g dalam 100 mL akuades steril sehingga diperoleh konsentrasi 1,0 M. Kemudian ditambahkan larutan HCl dengan konsentrasi serupa dan diukur menggunakan pH meter hingga mencapai pH 7,2-7,8.

Pembuatan Larutan Enzim Lipase

Larutan enzim dibuat dengan menimbang enzim lipase pankreas sebanyak 0,025 g yang selanjutnya dilarutkan ke dalam larutan buffer Tris-HCl 1,0 M pH 7,2-7,8 hingga mencapai volume 5 mL sehingga didapatkan larutan enzim sebesar 200 Unit/mL.

Pembuatan Larutan Substrat p-NPB

Substrat p-NPB ditimbang sebanyak 0,2092 g, lalu dilarutkan dalam asetonitril [7] hingga 10 mL. Konsentrasi substrat yang diperoleh yaitu sebesar 100 mM.

Pembuatan Larutan Standar Orlistat

Larutan induk orlistat dibuat pada konsentrasi 50 mg/mL, yaitu 250 mg dilarutkan dalam metanol hingga volume 5 mL. Selanjutnya dilakukan pengenceran larutan induk menggunakan metanol untuk mendapatkan larutan standar dengan rentang konsentrasi 0,05-35 mg/mL.

Pembuatan Ekstrak Sampel

Preparasi yang dilakukan yaitu menggunakan prinsip pembuatan infusa. Pada masing-masing simplisia ditimbang sebesar 1 g dan dilarutkan dalam aquades hingga mencapai volume 100 mL, sehingga didapatkan konsentrasi sebesar 1%. Sedangkan untuk ramuan jamu, seluruh simplisia ditimbang dengan masing-masing berat sepersepuluh bagian sesuai ramuan yaitu jati belanda 0,6 gram, tempuyung 0,6 g, jati cina 0,1 g, teh hijau 0,5 g, meniran 0,3 g, temulawak 0,5 g, dan kunyit 0,4 g yang kemudian dilarutkan dalam 100 mL aquades [6].

Aplikasi Biosensor Enzim Kertas pada Sampel Ekstrak Tanaman

Uji aktivitas antihiperlipidemia pada berbagai sampel tanaman tersebut dilakukan dengan mengimobilisasikan enzim lipase konsentrasi 200 Unit/mL sebanyak 4 μ L pada area deteksi, selanjutnya ditambahkan ekstrak sampel sebanyak 4 μ L dan diprainkubasi selama 15 menit pada suhu 37 $^{\circ}$ C, setelah itu direaksikan dengan 4 μ L substrat p-NPB konsentrasi 80 mM

lalu diinkubasi 30 menit pada suhu yang sama. Perubahan warna yang terbentuk setelah inkubasi kemudian dianalisis menggunakan program ImageJ untuk mengetahui nilai % inhibisi masing-masing sampel.

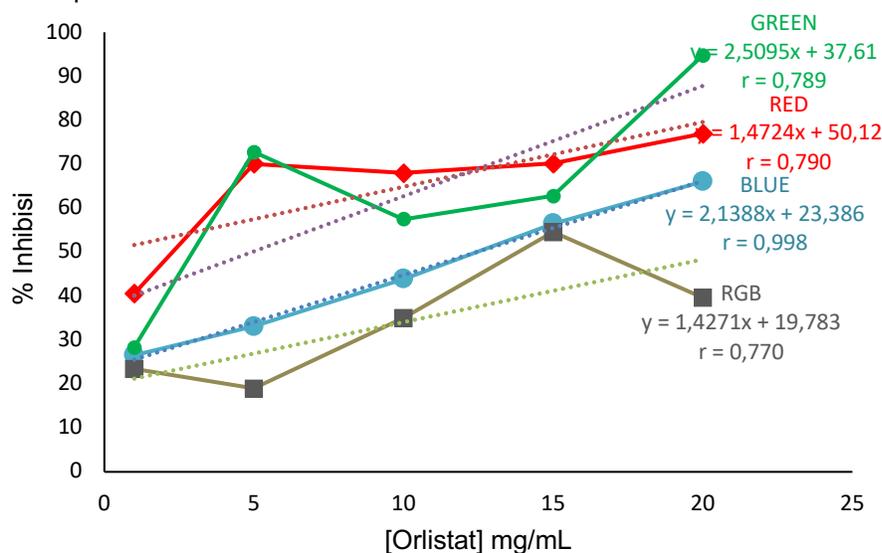
Perbandingan Hasil Metode Biosensor Enzim Kertas dengan Metode Spektrofotometri UV-Vis

Perbandingan hasil analisis antara metode biosensor kertas dengan metode spektrofotometri UV-Vis dilakukan dengan menggunakan uji *Independent Sample T-test* untuk membuktikan bahwa kedua metode yang tidak saling berhubungan satu sama lain mampu memberikan rata-rata hasil yang sama, kedua metode dapat dikatakan tidak berbeda signifikan apabila hasil uji *T-Test* ($p > 0,05$) [10].

Hasil

Kondisi Optimum Fabrikasi Biosensor Berbasis Kertas (*Paper Microzone Plates*)

Volume penetesan 4:4:4 μ L pada area deteksi dipilih sebagai volume optimum karena memberikan visualisasi perubahan warna paling baik yang memenuhi seluruh area deteksi biosensor tanpa mengalami kebocoran. Warna *Blue* dipilih sebagai warna yang optimum untuk respon biosensor karena memberikan nilai koefisien korelasi (r) paling mendekati 1 yaitu sebesar 0,998 berdasarkan hasil pada **Gambar 1**.

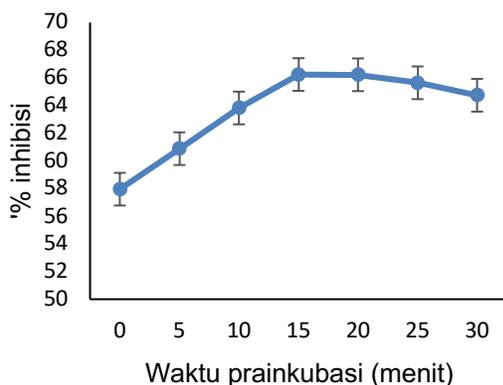


Gambar 1. Hasil kurva penentuan intensitas warna pada program *ImageJ*

Waktu prainkubasi yang paling optimum adalah 15 menit karena kenaikan nilai % inhibisi

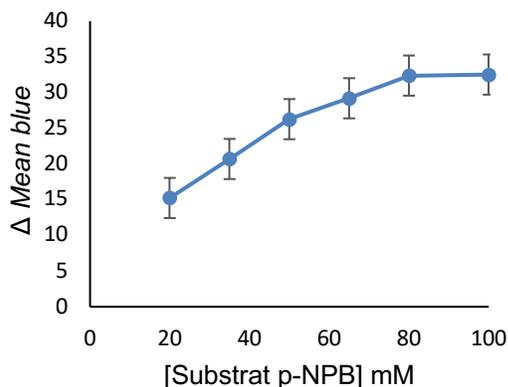
tidak berbeda jauh atau relatif tetap sehingga dapat dikatakan *steady state* pada rentang waktu

berikutnya. Hasil tersebut dapat diamati pada **Gambar 2** berikut ini.



Gambar 2. Kurva perolehan % inhibisi berdasarkan waktu prainkubasi

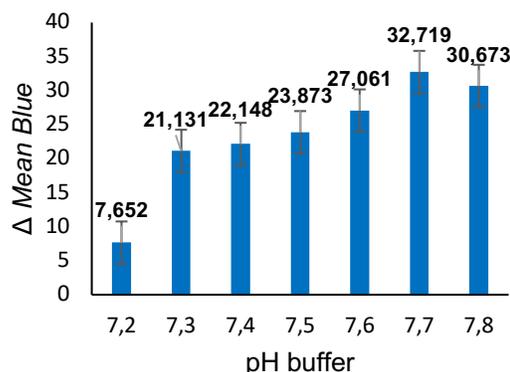
Hasil yang diperoleh untuk optimasi konsentrasi substrat berdasarkan **Gambar 3** yaitu substrat 80 mM dipilih sebagai konsentrasi optimum karena pada konsentrasi tersebut kurva telah mengalami kondisi *steady state* atau biosensor telah memberikan respon yang stabil. Tercapainya respon yang stabil karena hampir seluruh sisi aktif enzim bereaksi dengan substrat dan hampir tidak ada lagi produk *p-nitrophenol* yang terbentuk selama konsentrasi substrat ditingkatkan.



Gambar 3. Kurva optimasi konsentrasi substrat dengan nilai Δ Mean Blue

Optimasi pH memberikan hasil seperti pada **Gambar 4**, yang menunjukkan larutan buffer Tris-HCl pH 7,7 dipilih sebagai pelarut enzim lipase karena memberikan nilai Δ Mean Blue paling optimum sebesar 32,719. Nilai optimum tersebut menunjukkan bahwa biosensor mampu

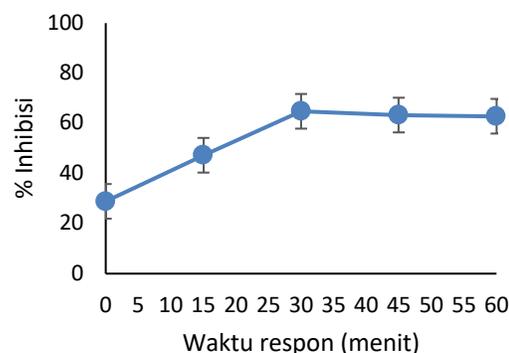
memberikan kinerja dengan respon deteksi yang optimal.



Gambar 4. Grafik optimasi pH buffer Tris-HCl 1,0 M berdasarkan nilai Δ Mean Blue

Karakterisasi Biosensor Kertas

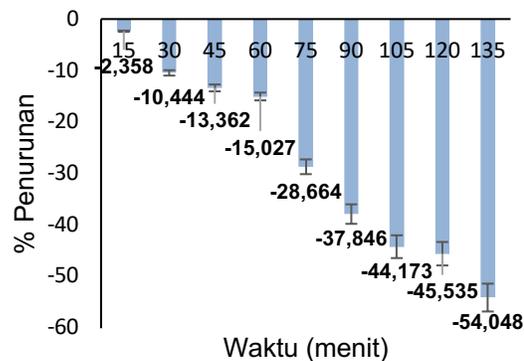
Hasil pengujian karakterisasi waktu respon yang diperoleh dapat dilihat pada **Gambar 5**. Kurva yang diperoleh menunjukkan bahwa waktu respon biosensor yang paling baik adalah 30 menit inkubasi substrat karena memberikan nilai % inhibisi yang optimum sebesar 64,792% dan *steady state* pada waktu berikutnya.



Gambar 5. Kurva penentuan waktu respon berdasarkan % inhibisi

Uji linieritas memberikan hasil persamaan regresi $Y = 22,09585 + 2,170514X$ dengan nilai koefisien korelasi ($r = 0,9996745$, nilai $V_{x0} = 1,509906\%$, dan nilai $X_p = 1,572533$ mg/mL. Hasil tersebut menunjukkan bahwa biosensor mampu memberikan respon deteksi yang proporsional dengan konsentrasi analit pada standar karena memenuhi beberapa parameter linieritas yaitu nilai koefisien korelasi (r) mendekati 1, V_{x0} mencapai $<5\%$ dan nilai X_p lebih rendah dari nilai konsentrasi standar terkecil [11]. Uji LOD dan LOQ biosensor didapatkan hasil yaitu untuk nilai

batas deteksi sebesar 1,573 mg/mL dan nilai batas kuantitasi sebesar 4,718 mg/mL. Uji presisi berdasarkan perolehan nilai RSD presisi pada standar selama tiga hari berturut-turut yaitu 0,495%, 0,565%, dan 0,856% dengan nilai rata-ratanya yaitu 0,639%. Sedangkan untuk sampel, nilai RSD pada 3 hari berturut-turut sebesar 2,232%, 2,621%, dan 2,781% dengan rata-rata sebesar 2,545%. Hasil yang diperoleh dari uji akurasi yaitu nilai % *recovery* untuk adisi standar 30%, 45%, dan 60% masing-masing adalah 98,836%, 99,777%, dan 99,054% sehingga dihasilkan % *recovery* rata-rata sebesar 99,222%. Berdasarkan hasil tersebut, biosensor dikatakan telah memenuhi kriteria penerimaan uji presisi dan akurasi, yaitu untuk konsentrasi analit pada standar dan sampel yang digunakan sebesar $\geq 1\%$ atau 10 mg/mL maka nilai RSD harus $\leq 2,8\%$ dan % *recovery* rata-rata yaitu sebesar 97-103% [12]. Waktu pakai biosensor berbasis kertas pada suhu ruangan berdasarkan kurva yang diperoleh seperti pada **Gambar 6** yaitu selama selama 45 menit.



Gambar 6. Grafik penurunan nilai % inhibisi berdasarkan waktu penyimpanan (menit) dalam suhu ruangan

Perbandingan Hasil Metode Biosensor Enzim Kertas dengan Metode Spektrofotometri UV-Vis

Perbandingan antara metode biosensor kertas dengan spektrofotometri UV-Vis berdasarkan hasil aktivitas inhibisi sampel dijelaskan pada **Tabel 2** berikut ini. Semua sampel memberikan nilai sig $> 0,05$ dengan tingkat kepercayaan 95%. Hal ini menandakan bahwa kedua metode tersebut tidak menunjukkan perbedaan yang signifikan.

Tabel 2. Perbandingan hasil analisis biosensor dan spektrofotometri UV-Vis (n= 3)

Sampel	% Inhibisi		Signifikasi (Nilai sig T)
	Biosensor	Spektrofotometri UV-Vis	
Tempuyung	54,926	52,936	0,583
Jati belanda	55,931	56,162	0,946
Jati cina	35,898	34,574	0,465
Meniran	41,357	40,943	0,913
Kunyit	41,931	41,646	0,944
Temulawak	48,507	47,105	0,580
Teh	42,563	42,887	0,829
Ramuan	45,646	45,451	0,953

Pembahasan

Biosensor berbasis kertas (*Paper Microzone Plates*) dibuat dari bahan kertas saring *Whatman* yang dicetak melalui teknik sablon dengan menggunakan tinta pasta karet berdasarkan desain yaitu terdiri dari lima kolom dan tiga baris lingkaran sebagai area deteksi (bagian kertas yang tidak disablon) yang berdiameter 0,8 cm. Biosensor ini menggunakan enzim lipase dan substrat p-NPB sebagai

bioelemen atau reagen yang diaplikasikan pada sampel ekstrak air (infusa) tanaman. Enzim lipase yang telah diimmobilisasikan pada area deteksi kemudian ditetaskan sampel dan dilakukan pra inkubasi selama 15 menit pada suhu $\pm 37^{\circ}\text{C}$, setelah itu ditetaskan substrat p-NPB dan dilakukan inkubasi kembali selama 30 menit pada suhu yang sama. Larutan enzim, sampel ekstrak tanaman, dan substrat yang ditetaskan sesuai kondisi analisis yang telah

dioptimasi pada area deteksi, yaitu menggunakan enzim lipase 200 Unit/ml; sampel konsentrasi 1%; substrat konsentrasi 80 mM dengan perbandingan volume 1:1:1 sebanyak 4:4:4 μ L, waktu inhibisi enzim 15 menit, dan larutan buffer pada pH 7,7. Warna yang akan terbentuk dengan adanya penambahan sampel setelah diinkubasi yaitu akan tetap berwarna putih atau hingga berubah menjadi kuning pudar. Hal ini disebabkan karena substrat yang diinkubasi mengalami reaksi hidrolisis oleh enzim lipase dan akan menghasilkan produk p-nitrofenol yang berwarna kuning, namun sampel yang mengandung analit dengan aktivitas antihiperlipidemia akan menghambat aktivitas enzim lipase sehingga produk hasil dari reaksi hidrolisis substrat tersebut akan terbentuk lebih sedikit atau hingga tidak sama sekali.

Kedelapan sampel yang digunakan berdasarkan formula saintifikasi jamu yaitu dalam bentuk ekstrak air (infusa) yang terdiri dari sebungk tanaman tempuyung, jati belanda, jati cina, meniran, kunyit, temulawak, dan teh dengan konsentrasi masing-masing sebesar 1%, serta ramuan atau campuran dari semua serbuk tanaman dengan konsentrasi 3% sesuai komposisi pada formula [6]. Tanaman yang memiliki nilai % inhibisi tertinggi adalah jati belanda dan yang paling rendah yaitu jati cina. Aktivitas inhibisi bila diurutkan dari yang tertinggi hingga terendah yaitu jati belanda > tempuyung > temulawak > ramuan > teh > kunyit > meniran > jati cina. Prinsip penghambatan aktivitas enzim lipase oleh berbagai ekstrak tanaman tersebut yaitu kandungan metabolit sekunder yang terlarut seperti golongan senyawa polifenol dan lainnya, mampu mengikat sisi aktif serin pada enzim lipase dengan adanya interaksi ligan-protein melalui pembentukan ikatan hidrogen pada berbagai asam amino pada sisi aktif [13]. Jati belanda sebagai tanaman yang menghasilkan aktivitas anti-hiperlipidemia terbesar dalam penelitian ini sebelumnya telah diketahui memiliki kandungan senyawa penciri yaitu kuersetin sebagai antikolesterol [14], sehingga sering digunakan sebagai alternatif pengobatan oleh dokter praktik jamu untuk pasien hiperlipidemia pada fasilitas pelayanan kesehatan seperti puskesmas [15].

Berdasarkan perbandingan hasil antara metode biosensor dan spektrofotometri UV-Vis, diperoleh hasil bahwa signifikansi semua sampel memberikan nilai sig >0,05 dengan tingkat kepercayaan 95%. Hal ini menandakan bahwa kedua metode tersebut tidak menunjukkan perbedaan yang signifikan, sehingga dapat

diketahui bahwa metode biosensor berbasis kertas dapat diterapkan sebagai metode alternatif dalam menentukan aktivitas antihiperlipidemia pada sampel ekstrak tanaman.

Simpulan dan Saran

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, metode biosensor dapat diaplikasikan pada ekstrak tanaman karena mampu memberikan hasil pengukuran aktivitas antihiperlipidemia yang telah memenuhi karakteristik linieritas, batas deteksi (LOD), batas kuantitasi (LOQ), presisi, dan akurasi. Biosensor berbasis kertas dapat menjadi metode alternatif yang lebih mudah dan praktis karena memberikan hasil analisis yang tidak berbeda signifikan dengan metode instrumental spektrofotometri UV-Vis. Saran untuk penelitian ini yaitu perlu dilakukan pengembangan lebih lanjut untuk meningkatkan performansi pada biosensor.

Ucapan Terima Kasih

Peneliti mengucapkan terimakasih kepada Fakultas Farmasi, Universitas Jember yang telah membantu dan mendukung terlaksananya penelitian ini.

Daftar Pustaka

- [1] Barbara G. Wells, Terry L. Schwinghammer, Joseph T. Dipiro, Dipiro C V. *Pharmacotherapy Handbook*. 10th ed. New York: McGraw Hill Education; 2017.
- [2] Mardiana L. *Daun Ajaib Tumpas Penyakit*. Jakarta: Penebar Swadaya; 2012.
- [3] Swierczewska A, Buchholz T, Melzig MF, Czerwi ME. In vitro α -amylase and pancreatic lipase inhibitory activity of *Cornus mas* L. and *Cornus alba* L. fruit extracts a. 2018;7:1–10.
- [4] Moniem A, Hassan S. TLC Bioautographic Method for Detecting Lipase Inhibitors. 2011;(October):3–5.
- [5] Dechakhamphu A, Wongchum N. Screening for anti-pancreatic lipase properties of 28 traditional Thai medicinal herbs. *Asian Pac J Trop Biomed* [Internet]. Elsevier (Singapore) Pte Ltd; 2015;1–4. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.apjtb.2015.09.012>
- [6] Novianto F. *Jamu Saintifik Suatu Lompatan Ilmiah Pengembangan Jamu*.

- Tawangmangu: Balai besar Penelitian dan Pengembangan Tanaman obat dan Obat tradisional; 2017. 83 p.
- [7] Jaradat N. Anti-Lipase Potential of the Organic and Aqueous Extracts of Ten Traditional Edible and Medicinal Plants in Palestine; a Comparison Study with Orlistat. 2017;
- [8] World Health Organization. Guidelines On Validation – Appendix 4: Analytical Method Validation. 2016;(June):1–11.
- [9] Kuswandi B. Biosensor: Konsep, Desain, dan Eksperimentasi. Jember: Jember University Press; 2010.
- [10] Sujarweni VW. SPSS Untuk Penelitian. 1st ed. Yogyakarta: Yogyakarta Pustaka Baru Press; 2014. 97-100 p.
- [11] Yuwono M, Indrayanto G. Validation of Chromatographic Methods of Analysis. 2005;32(05).
- [12] Huber L. Validation and Qualification in Analytical Laboratories. Vol. 2. 2007.
- [13] Luo S, Gill H, Anthony D, Li M, Hung A, Toan L, et al. The inhibitory effects of an eight-herb formula (RCM-107) on pancreatic lipase: enzymatic , HPTLC pro fi ling and in silico approaches. Heliyon [Internet]. Elsevier Ltd; 2019;5(August):e02453. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e02453>
- [14] Batubara I, Darusman LK, Mitsunaga T. Senyawa Penciri Ekstrak Daun Jati Belanda (Guazuma ulmifolia Lamk) sebagai Anti-Kolesterol (Marker Compound of Jati Belanda (Guazuma ulmifolia Lamk) Extract as. 2017;22(2):87–91.
- [15] Gitawati R, Widowati L, Suharyanto F. Penggunaan Jamu pada Pasien Hiperlipidemia Berdasarkan Data Rekam Medik , di Beberapa Fasilitas Pelayanan Kesehatan di Indonesia. 2015;41–8.