

## KAJIAN PEMEGUNAN SEBATIAN FEROSENA DALAM MEMBRAN POLIMER UNTUK KEGUNAAN BIOSENSOR

Low Sim Bean, \*\*Lee Yook Heng, Bohari M. Yamin & Musa Ahmad

*Pusat Pengajian Sains Kimia dan Teknologi Makanan,  
Fakulti Sains dan Teknologi,  
Universiti Kebangsaan Malaysia, Bangi, Selangor Darul Ehsan*

\*\*Corresponding author  
E-mail: yhl000@pkriscc.ukm.my

### Abstrak.

Dalam pembinaan perideria-bio elektrokimia yang menggunakan elektrod berenzim redoks, agen perantara (mediator) banyak digunakan. Ferrosena dan sebatian terbitannya merupakan agen perantara yang paling lazim digunakan. Penggunaan sebatian ferrosena untuk menggantikan oksigen sebagai penerima elektron bagi enzim jenis oksidase bukan sahaja dapat meningkatkan kadar perindahan elektron antara pusat redoks enzim dengan elektrod, malahan juga dapat mengurangkan kelebihan keupayaan yang tidak diinginkan dan ini turut merendahkan keupayaan sistem serta meningkatkan keselektifannya. Namun masalah utama yang dihadapi dalam pemegunan ferrosena pada permukaan elektrod adalah kesan larutlesap ferrosena/fericinium ke dalam larutan pukal. Pada peringkat penyelidikan ini pemegunan ferrosena dalam beberapa jenis polimer terbitan metakrilat dan poli(HEMA) telah dilakukan. Selain itu, kelarutlesapan bagi ferrosena yang terpegun turut dikaji.

### Abstract.

Mediators are widely used in the construction of redox enzyme electrodes for biosensors. Ferrocene and its derivatives have attracted much attention from researchers and they are the most widely used mediators. They have been used to replace oxygen as an electron acceptor for the oxidase enzymes. Mediators will not only increase the electron transfer rate between the enzyme active center and the electrode, but also reduce the undesirable overpotential, thus reduce the system potential and increase its selectivity. However, the major problem faced in the entrapment of ferrocene at the electrode surface is the leaching of the ferrocene-ferricinium into the bulk solution. As a preliminary study, the entrapment of ferrocene in methacrylate derived polymers and poly(HEMA) was carried out. The leaching of the entrapped ferrocene was also studied.

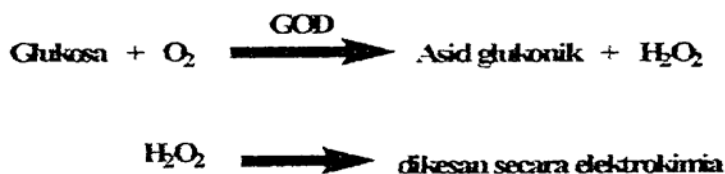
**Keywords:** Ferrocene, biosensor, leaching, glucose oxidase.

### PENGENALAN

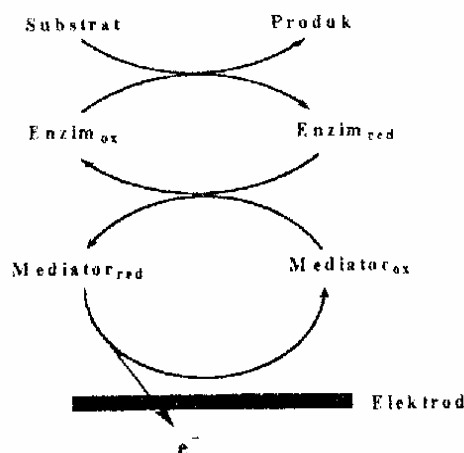
Sensor elektrokimia (electrochemical sensor) merupakan suatu alat yang bertindak untuk menukarkan proses pengoksidaan atau penurunan sesuatu analit yang berkenaan kepada suatu isyarat elektrik. Pengoksidaan atau penurunan analit tersebut berlaku pada permukaan suatu elektrod yang keupayaannya dikawal relatif kepada elektrod lawannya. Dalam bidang pembinaan biosensor, sensor elektrokimia bertindak untuk mengukur proses pengangkutan elektron yang disebabkan tindak balas redoks bermangkikan enzim. Pada amnya, jenis transduser biosensor elektrokimia dibahagikan kepada amperometri, potentiometri, konduktometri, voltametri, koulometri, polarografi dan impedimetri. Dalam penyelidikan ini, suatu prototaip iaitu sejenis membran polimer berferrosena yang baru akan disintesis dan digunakan untuk aplikasi biosensor jenis amperometrik. Dalam penggunaan transduser amperometri, suatu voltan tetap dibekalkan antara dua elektrod dan arus elektrik yang dihasilkan dengan tindak balas elektrod akan ditentukan.

Tindak balas redoks berenzim memerlukan adanya antaramuka dengan transduser elektrokimia supaya langkah pertukaran elektron dapat berlaku. Namun, pemindahan elektron terus daripada pusat aktif enzim kepada permukaan elektrod sering direncat oleh kesan sterik tertentu. Ini disebabkan kofaktor enzim terletak jauh ke dalam molekul enzim dan mengakibatkan pemindahan elektron terus daripada pusat redoks enzim kepada elektrod konvensional adalah sangat perlahan dan tidak dapat diukur. Kaedah biasa untuk memudahkan pemindahan elektron adalah dengan memasukkan oksigen ke dalam sistem kerana ia adalah penerima elektron semulajadi bagi enzim oksidase. Oksigen kemudiannya diturunkan kepada  $H_2O_2$  yang boleh dikesan secara elektrokimia.

Namun, terdapat beberapa kekurangan melalui pendekatan ini, iaitu pengoksidaan  $H_2O_2$  memerlukan keupayaan yang tinggi, maka sensor mengalami gangguan daripada spesies elektroaktif lain seperti asid askorbik dan urik yang mengoksida pada keupayaan sama.  $H_2O_2$  yang terhasil boleh menyebabkan degradasi GOD dalam pembinaan biosensor glukosa. Arus yang terhasil bukan sahaja bergantung kepada kepekatan analit tetapi juga pada tekanan separa oksigen dalam sampel dan kebergantungan proses pengoksidaan  $H_2O_2$  kepada pH menyebabkan arus terhasil juga berubah mengikut pH. Maka, suatu elektrokatalis ataupun bahan perantara (mediator) yang boleh dijana semula pada permukaan elektrod dimasukkan ke dalam sistem sensor tersebut untuk menggantikan oksigen. Bahan perantara merupakan suatu molekul kecil yang dapat sampai ke pusat redoks enzim dan membaur keluar ke elektrod dengan membawa cas. Perantara redoks yang lazim ialah kuinon, terbitan ferosena, kompleks osmium(II) dan ion heksasianoferat(III). Persamaan umum yang terlibat adalah seperti berikut:



Sebab-sebab perantara diperlukan adalah ia dapat mengurangkan kelebihan keupayaan (overpotential) yang tidak diinginkan, merendahkan keupayaan sistem, meningkatkan keselectifan sistem, tiada enzim kedua diperlukan, dan menghapuskan kebergantungan terhadap kepekatan oksigen dalam medium tindak balas. Rajah 1 di bawah menunjukkan skema tindak balas bagi elektrod enzim amperometrik terlibat bahan perantara.



Rajah 1. Skema tindak balas bagi elektrod enzim amperometrik terlibat bahan perantara

Perantara yang dipilih dalam penyelidikan ini ialah ferosena dan ia akan dipegunkan dalam membran polimer jenis akrilat untuk pembina biosensor. Sebab-sebab ferosena dipilih sebagai perantara dalam penyelidikan ini ialah atom besi dalam sebatian ferosena merupakan kupel redoks yang berkesan, sifat elektrokimia redoks yang baik menjadikannya suatu piawai elektrokimia. Ia mempamerkan kupel redoks bebalik dengan  $E_{1/2}$  yang rendah pada +165 mV terhadap SCE dan banyak terbitannya dapat mengekalkan pusat redoks ini dengan perubahan sifat yang minimum. Ia juga menunjukkan sifat keberkesanan

penerimaan elektron pada pH optimum menghampiri pH fisiologi, pH yang serupa dengan oksigen, dan menunjukkan elektrokimia berbalik berbanding dengan elektrokimia oksigen yang tidak berbalik, maka tiada pengurangan spesies elektroaktif berlaku.

Terdapat beberapa cara umum untuk memegunkan ferosena pada permukaan elektrod. Antaranya ialah jerapan ferosena pada permukaan elektrod, penyerakan dalam adunan karbon<sup>1-3</sup>, pengkupelan kepada tulang belakang polimer konduktif<sup>4</sup> ataupun penyangkutan secara kovalen kepada lapisan glikoprotein enzim<sup>5</sup>. Namun pemegunan ferosena secara jerapan dan penyerakan dalam adunan karbon sering mengalami masalah kelarutlesapan ferosena/ferosenium ke dalam larutan pukat. Masalah ini perlu dititikberatkan terutamanya dalam pembinaan biosensor untuk kegunaan *in vivo*. Manakala modifikasi enzim dengan ferosena juga mengakibatkan kehilangan aktiviti enzim yang signifikan. Maka kaedah yang paling baik adalah dengan mengikatkan ferosena pada polimer.

Dalam penyelidikan ini, ferosena akan dipegunkan dalam polimer jenis metakrilat-akrilat. Keberkesanan pemegunan ferosena dalam membran polimer ini dapat ditingkatkan kerana ferosena telah terperangkap dalam polimer dan kesan larutlesapnya keluar boleh dielakkan. Pada peringkat awal penyelidikan ini, pemegunan ferosena dalam beberapa jenis polimer terbitan metakrilat-akrilat iaitu MB37 dan MB46 serta poli(HEMA) telah dilakukan. Selain itu, kajian larutresap bagi ferosena yang terpegun turut diadakan.

## EKSPERIMEN

### Penyediaan polimer MB 37 dan MB46

Dalam penyediaan polimer MB37, 1.83 g polimer metil metakrilat dan 4.27g n-butil akrilat, 5 mL benzena dan 0.010 g benzoil peroksida ditimbang dan dimasukkan ke dalam kelalang bulat 50 mL untuk proses pempolimeran. Campuran dipanaskan dalam kukus minyak parafin pada suhu 80-110 °C selama 7 jam. Larutan polimer terhasil dibiarkan sejuk dan ditambah dengan petroleum eter serta dikacau. Pepejal putih yang melekat akan terbentuk dan petroleum eter yang keruh dibuang dan ditambah lagi dengan yang baru. Langkah ini diulangi sehingga kekeruhan tidak kelihatan. Polimer dibiarkan kering dalam kebuk wasap dan ditutupi dengan kertas ahmunium. Proses pengeringan biasanya mengambil 1-2 hari. Dalam penyediaan polimer MB46, langkah-langkah yang sama dilakukan tetapi 2.44 g metil metakrilat dan 3.06 g n-butil akrilat digunakan.

### Penyediaan poli(HEMA)

Dalam penyediaan poli(HEMA). Larutan I dan larutan II disediakan seperti komposisi yang ditunjukkan dalam Jadual 1.

Jadual 1. Komposisi untuk campuran yang diperlukan untuk penyediaan filem poli(HEMA)

	Poli(HEMA) (mg)	Air suling ( $\mu$ L)	Dioksana ( $\mu$ L)
Larutan I	-	800	200
Larutan II	60	800	200

Sebanyak 45  $\mu$ L larutan I dan 30  $\mu$ L larutan II dicampurkan. Campuran ini digoncang sehingga menjadi homogen dan seterusnya digunakan untuk membentuk filem poli(HEMA).

### Kajian sifat penyerapan air oleh polimer

Slaid kaca yang berukuran 2.5 x 2.5 cm disediakan serta ditimbang. Sebanyak 500  $\mu$ L larutan polimer MB37 disalutkan ke atas slaid kaca tersebut serta dikeringkan selama 2 hari. Setelah pengeringan, slaid kaca yang ada filem polimer ditimbang sekali lagi dan berat filem polimer ditentukan. Slaid kaca dengan filem polimer ini kemudiannya direndam dalam 10 mL larutan penimbal fosfat 0.1 M. Setelah 5 minit, ia dikeluarkan dan ditimbang semula. Berat air yang diserap oleh filem polimer dapat ditentukan. Langkah ini

diulangi bagi tempoh masa yang berbeza. Ujikaji ini dilakukan dengan menggantikan polimer MB37 oleh polimer MB46 dan poli(HEMA).

#### *Kajian larutlesap bagi ferosena terpegun dalam polimer*

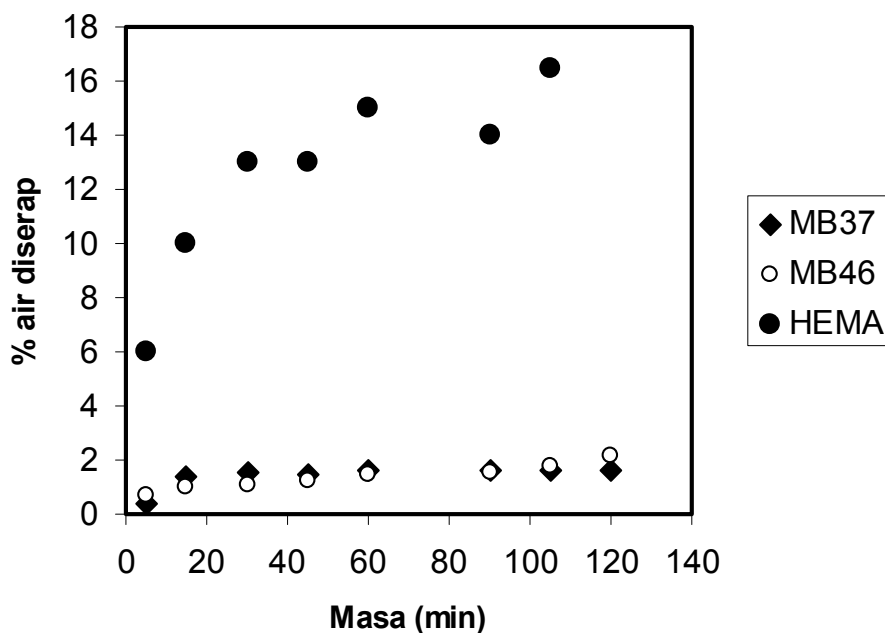
Sebanyak 0.05 g ferosena dimasukkan ke dalam 1 mL larutan polimer MB 37. Sebanyak 500  $\mu$ L campuran tersebut disalutkan ke atas slaid kaca berukuran 2.5 cm x 2.5 cm. Slaid tersebut dibiarkan kering untuk selama 2 hari dan selepas itu direndam dalam 50 mL larutan penimbal fosfat 0.1 M. Setelah 5 min, 5 mL larutan penimbal dikeluarkan dari bikar. Langkah ini diulangi bagi tempoh masa yang lain. Langkah-langkah di atas diulangi dengan menggantikan polimer MB 37 oleh polimer MB 46.

Sebanyak 450  $\mu$ L larutan poli(HEMA) disalutkan ke atas slaid kaca berukuran 2.5 cm x 2.5 cm. Berat ferosena sebanyak 0.01g dilarutkan ke dalam 120  $\mu$ L pelarut THF. Sebanyak 50  $\mu$ L daripada larutan ferosena dicampurkan dengan larutan poli(HEMA) yang telah disalutkan di atas slaid kaca tadi. Slaid itu kemudian dibiarkan mengering selama 2 hari. Selepas itu, slaid dengan filem polimer direndamkan dalam 50 mL larutan penimbal fosfat 0.1 M. Setelah 5 min rednaman, 5 mL larutan penimbal dikeluarkan serta dianalisis kandungan Fe dengan menggunakan spektrofotometer serapan atom (AAS). Kuantiti Fe yang hadir akan menunjukkan kesan larutlesap ferosena yang terpegun dalam filem ke larutan pukal.

### KEPUTUSAN DAN PERBINCANGAN

#### *Kajian sifat penyerapan air bagi polimer*

Rajah 2 menunjukkan sifar penyerapan air bagi polimer MB37, MB46 dan poli(HEMA) dalam suatu tempoh masa tertentu. Didapati bahawa pada peringkat awal kajian, iaitu 90 minit yang pertama, peratus air yang diserap oleh filem polimer MB37 adalah lebih tinggi daripada yang diserap oleh polimer MB46. Penyerapan air bagi polimer MB37 hampir mencapai ketepuan selepas 2 jam, manakala peratus air yang diserap oleh polimer MB46 masih menunjukkan peningkatan yang hampir linear. Namun, sifat penyerapan air bagi kedua-dua polimer ini boleh dikatakan lebih kurang sama dan di bawah paras 2%. Antara ketiga-tiga polimer yang dikaji, poli(HEMA) adalah paling banyak menyerap air, iaitu mendekati 20% pada minit ke-110.



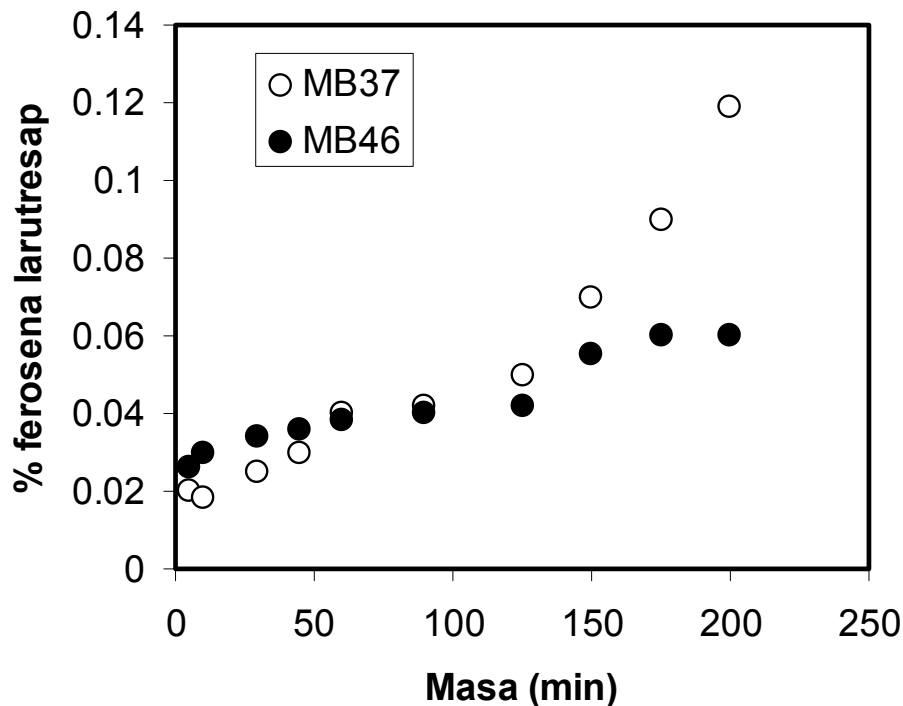
Rajah 2. Profil penyerapan air oleh tiga jenis filem polimer MB37, MB46 dan HEMA.

#### *Kajian kelarutresapan ferosena terpegun dalam polimer*

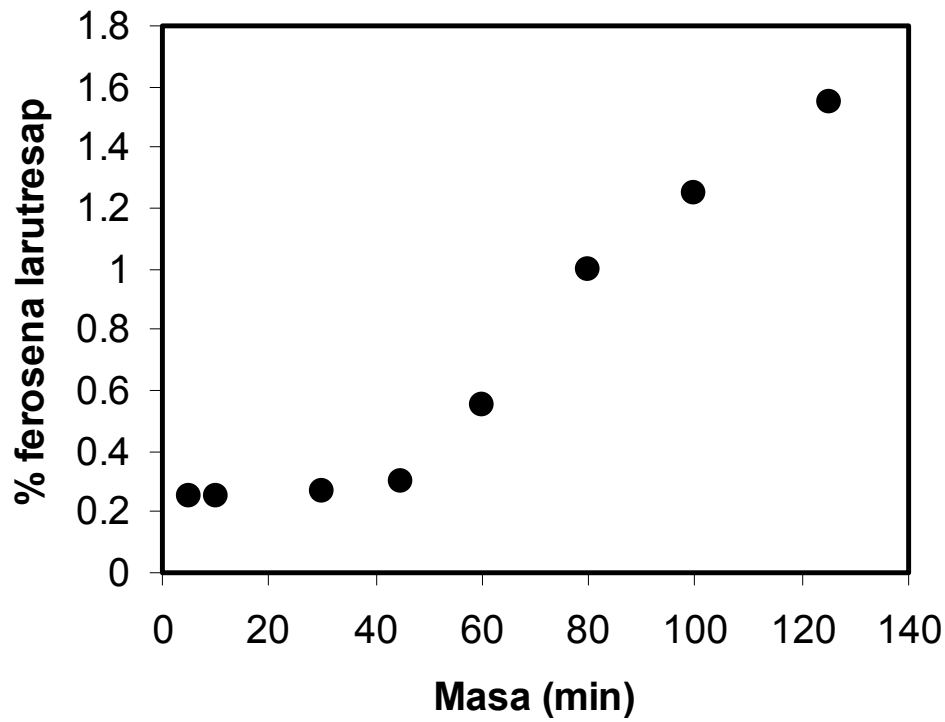
Rajah 3 dan 4 pula masing-masing memaparkan hasil kajian larutresap bagi ferosena yang terpegun dalam polimer MB37, MB46 dan poli(HEMA). Dapat diperhatikan bahawa pada 120 minit yang pertama sifat larutresap ferosena dalam filem polimer MB46 dan MB37 adalah hampir sama. Namun selepas itu, ferosena yang terpegun dalam polimer MB37 lebih banyak melarutresap keluar berbanding dengan MB46. Ini disebabkan polimer MB46 lebih bersifat hidrofobik kerana mengandungi lebih banyak metil metakrilat. Ferosena yang terpegun dalam poli(HEMA) didapati paling mudah melarutresap keluar dan kira-kira 1.6% kelarutresapan ferosena ke dalam larutan dapat diperhatikan pada jam yang ke-2. Amon ferosena yang melarutresap keluar adalah hampir 10 kali lebih tinggi berbanding dengan MB37 atau MB46. Oleh itu, bagi tujuan pemegunan ferosena sebagai bahan perantaraan untuk biosensor elektrokimia, polimer MB46 dijangka adalah terbaik kerana kelarutresapan ferosena dengan masa adalah paling rendah.

*Korelasi antara sifat penyerapan air dan kesan larutresap ferosena*

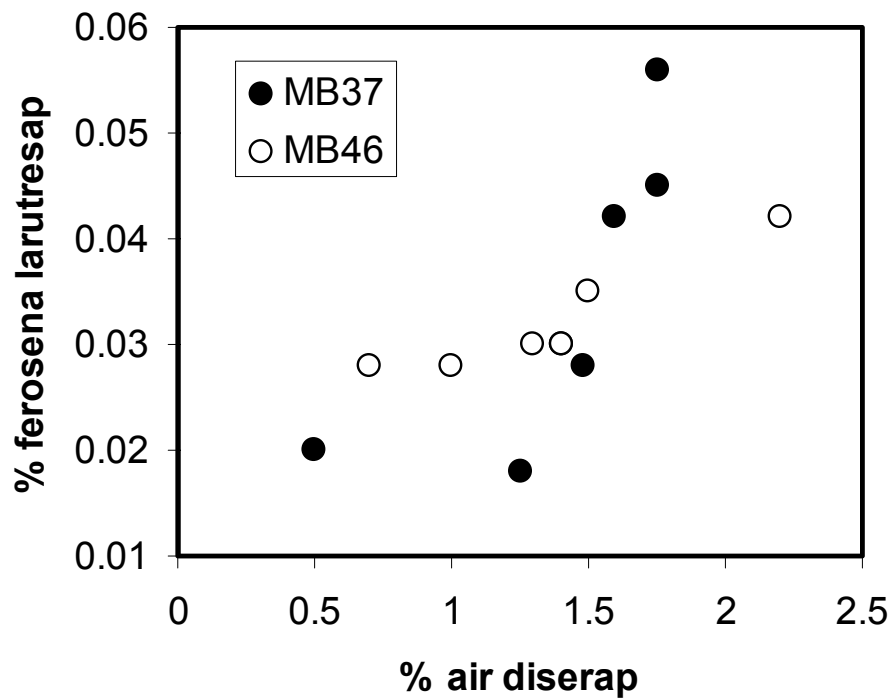
Korelasi antara sifat penyerapan air bagi polimer dan kesan larutresap ferosena terpegun dalamnya masing-masing dipaparkan dalam Rajah 5 dan 6 untuk polimer MB37, MB46 dan poli(HEMA). Kelarutan ferosena dalam air adalah kurang daripada 0.1 mg/L<sup>6</sup>. Untuk semua polimer, pada permulaannya peningkatan tahap kelarutresapan ferosena dengan penyerapan air tidak dapat diperhatikan. Tetapi ferosena mulai melarutresap keluar dengan cepat apabila penyerapan air melebihi 1.3, 1 dan 12 % masing-masing dalam polimer MB37, MB46 dan poli(HEMA). Apabila berat air yang diserap oleh polimer meningkat, peratus ferosena yang melarutresap keluar juga meningkat. Kesan larutresap ferosena pada poli(HEMA) adalah paling besar. Ini didorongkan oleh sifat hidrofilik poli(HEMA) yang menjadikannya mudah kembang dalam air dan seterusnya menggalakkan kelarutresapan ferosena keluar filem.



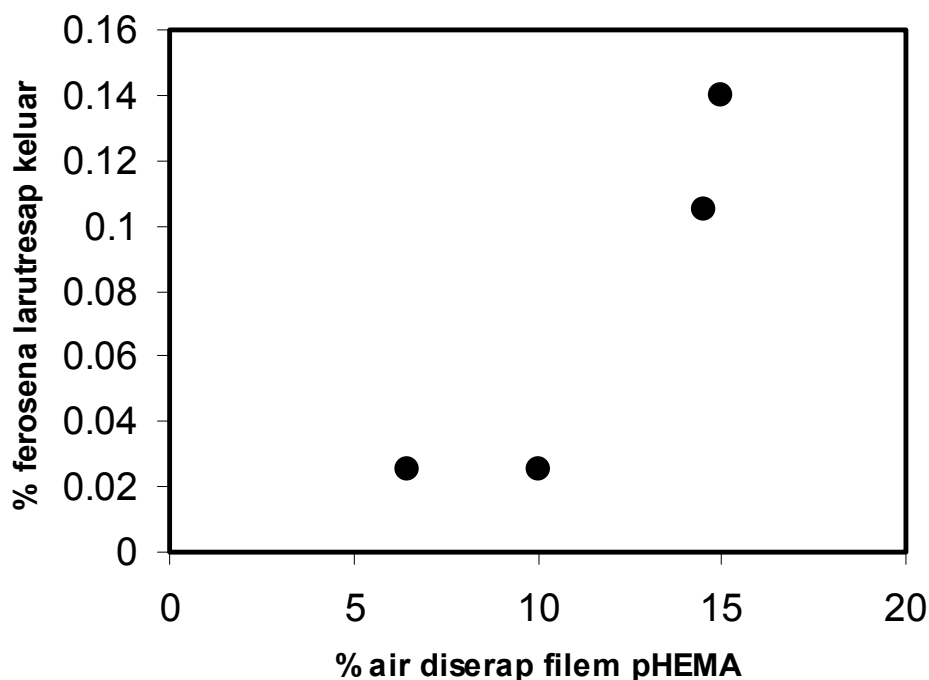
Rajah 3. Profil kelarutresapan ferosena yang terpegun dalam filem polimer MB37 dan MB46.



Rajah 4. Profil kelarutresapan ferrosena yang terpegun dalam filem polimer jenis poli(HEMA).



Rajah 5. Korelasi antara peratus air diserap oleh filem polimer MB37 dan MB46 dengan peratus ferrosena terpegun yang melarutresap keluar.



Rajah 6. Korelasi antara peratus air diserap oleh filem poli(HEMA) dengan peratus ferosena terpegun yang melarutresap keluar.

### KESIMPULAN

Kesimpulannya polimer MB46 yang lebih banyak mengandungi metil metakrilat adalah lebih hidrofobik daripada MB37 dan ia juga dapat memerangkap ferosena dengan kesan kelarutresapan yang sedikit. Poli(HEMA) pula didapati adalah tidak sesuai untuk pemerangkapan ferosena kerana ia mudah kembang dalam air dan ini menyebabkan kesan larutresap ferosena daripadanya juga menjadi besar.

### PENGHARGAAN

Penghargaan kepada MOSTI yang menyediakan geran penyelidikan melalui projek IRPA 09-02-02-0002-EA0057 dan biasiswa NSF kepada Low Sim Bean.

### RUJUKAN

1. Dicks, J.M., Aston, WJ, Davis, G & Turner, A P.T 1986. Mediated amperometric biosensors for D-galactose, glycolate and L-amino acids based on a ferrocene-modified carbon paste electrode. *Anal. Chim. Acta* **182**: 103-112.
2. Wang, J, Gicene, B & Morzgan, C 1984. Carbon paste electrodes modified with cation-exchange resin in differential pulse voltametry. *Anal. Chim. Acta*. **158**, 15-22.
3. Ware, I., Wu, L.H, Lu, Z.L, Li, R.L & Sanchez, J. 1990. Mixed ferrocene-glucose oxidase-carbon-paste electrode for amperometric determination of glucose. *Anal. Chim. Acta* **228**, 251-257.
4. Hale, P.D., Inagaki, T., Karen, H.I, Okamoto, Y. & Skotheim, T A 1989. A new class of amperometric biosensor incorporating a polymeric electron-transfer mediator. *J. Am. Chem. Soc.* **111**, 3482-3484

5. Degani, Y. and Heller, A. 1987. Direct electrical communication between chemically modified enzymes and metal electrodes: I. Electron transfer from glucose oxidase to metal electrodes via electron relays bound covalently to enzyme. *Journal of Phys. Chem.* **91**(6) 1287-1289.
6. NTP Chemical Repository MSDS for ferrocene. ↵