



Isian Substansi Proposal **SKEMA PENELITIAN DASAR**

Petunjuk: Pengusul hanya diperkenankan mengisi di tempat yang telah disediakan sesuai dengan petunjuk pengisian dan tidak diperkenankan melakukan modifikasi template atau penghapusan di setiap bagian.

JUDUL

Tuliskan Judul Usulan

Pengembangan biosensor elektrokimia berasaskan bio-polimer termodifikasi untuk deteksi amina biogenik di dalam makanan dan minum

RINGKASAN

Ringkasan penelitian tidak lebih dari 300 kata yang berisi urgensi, tujuan, dan luaran yang ditargetkan.

Seiring dengan bertambahnya populasi manusia serta berkembangnya ilmu pengetahuan dan teknologi, kebutuhan akan pangan menjadi semakin tinggi serta variasi dalam produksi makanan dan minuman pun semakin bertambah untuk memenuhi kebutuhan hidup manusia. Beberapa senyawa penting (*major compounds*) dibutuhkan dalam pertumbuhan badan manusia seperti karbohidrat, protein dan lemak. Protein menjadi salah satu komponen utama dalam membina otot serta mengganti tisu otot yang sudah rusak. Akan tetapi, asam amino yang merupakan komponen penyusun senyawa protein dapat berubah menjadi amina biogenik yang mana senyawa amina biogenik dapat menimbulkan reaksi negatif apabila masuk ke dalam aliran darah dalam jumlah tertentu. Senyawa amina biogenik seperti histamin, kadaverin, putresin dan tiramin. Senyawa ini ada pada makanan yang mengandung senyawa protein, baik makanan mentah maupun makanan dan minuman yang sudah diolah seperti keju, yogurt, susu serta makanan-makanan kaleng.

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengembangkan metode analisis senyawa amina biogenik yang dapat ditemui di dalam makanan dan minum yang mengandung amina biogenik dengan menggunakan metode elektrokimia sensor. Desain penelitian ini merupakan penelitian eksperimental (*Experimental design*) yang akan mengembangkan instrumen elektrokimia sensor yang dapat digunakan untuk menganalisis senyawa amina biogenik dalam makanan dan minuman. Instrumen ini juga akan dibandingkan dengan instrumen konvensional yang bisa digunakan untuk menganalisis senyawa amina biogenik seperti kromatografi cair (HPLC), kromatografi gas (GC) dan spektroskopi inframerah (FTIR).

Beberapa variabel yang dapat diamati seperti sintesis polimer terkonduktif (*conducting polymer*), penggunaan skrin elektroda bercetak (*screen printed electrode*), dan penggunaan material terkonduksi. Setelah pengembangan elektrokimia sensor berhasil dikembangkan dan divalidasi, analisis amina biogenik dilakukan, makanan dan minuman yang mengandung protein serta sering dikonsumsi masyarakat di Indonesia, khususnya di Yogyakarta dipilih untuk mengetahui konsentrasi amina biogenik yang terkandung di dalamnya. Dalam penelitian yang bersifat multi-tahun, tim peneliti menargetkan 2 luaran berupa jurnal internasional bereputasi (*accepted*) serta 1 buku referensi yang ber-ISBN dan 1 HKI.

KATA KUNCI

Kata kunci maksimal 5 kata

Amina biogenik; analisis; biopolimer; biosensor

PENDAHULUAN

Penelitian Dasar merupakan riset yang memuat temuan baru atau pengembangan ilmu pengetahuan dari kegiatan riset yang terdiri dari tahapan penentuan asumsi dan dasar hukum yang akan digunakan, formulasi konsep dan/ atau aplikasi formulasi dan pembuktian konsep fungsi dan/ atau karakteristik penting secara analitis dan eksperimental.

Pendahuluan penelitian tidak lebih dari 1000 kata yang terdiri dari:

- A. Latar belakang dan rumusan permasalahan yang akan diteliti
- B. Pendekatan pemecahan masalah
- C. *State of the art* dan kebaruan
- D. Peta jalan (*road map*) penelitian 5 tahun kedepan (jika dalam bentuk konsorsium harus dilengkapi dengan roadmap penelitian konsorsium)
- E. Sitasi disusun dan ditulis berdasarkan sistem nomor sesuai dengan urutan pengutipan, mengikuti format Vancouver

A. Latar belakang dan rumusan permasalahan yang akan diteliti

Setiap tahun, jutaan kasus penyakit karena makanan (keracunan makanan) yang disebabkan oleh bermacam – macam faktor terjadi di seluruh dunia [1]. Deteksi dan kuantifikasi bahan berbahaya di dalam makanan, serta perlindungan terhadap pembusukan yang disebabkan oleh bahan – bahan tersebut adalah tugas utama dari peneliti – peneliti kimia yang bertujuan sangat penting bagi kesehatan masyarakat [2]. Menurut WHO, lebih dari 200 penyakit disebabkan oleh makanan dan minuman dan sebagian besar masyarakat akan terserang keracunan makanan di beberapa fase dalam kehidupan mereka (FDA & CDCP). Selain itu, angka sebenarnya lebih tinggi karena banyak kasus penyakit keracunan makanan yang tidak terdeteksi dan tidak dicatat oleh otoritas kesehatan terkait, dikarenakan sulitnya membangun hubungan sebab akibat antara kontaminasi makanan dan penyakit atau kematian [3].

Ini menyoroti betapa pentingnya memastikan bahwa makanan yang kita konsumsi tidak terkontaminasi dengan unsur-unsur yang berpotensi mengancam kesehatan. Makanan dapat terkontaminasi di setiap titik di sepanjang rantai pasokan global selama produksi, distribusi, dan persiapan-konsumsi di lakukan. Ke semua individu di sepanjang rantai ini, dari produsen hingga konsumen, memiliki peran untuk memastikan bahwa makanan yang kita makan tidak menyebabkan penyakit. Selanjutnya, jika kita ingin mencegah penyakit tersebut, kita harus memperoleh pemahaman yang lebih dalam tentang asal mula penyakit bawaan makanan dan cara pengendaliannya. Di antara racun makanan yang paling banyak dikenal adalah amina biogenik. Amina biogenik (AB) adalah kelas senyawa organik yang terbentuk melalui dekarboksilasi asam amino oleh mikroorganisma [4].

Pembentukan AB dapat terjadi selama pemrosesan dan penyimpanan makanan yang menyebabkan bakteri merangsang berlakunya dekarboksilasi. AB juga digunakan sebagai indikator dalam menilai kualitas makanan tersebut. Di antara bermacam – macam AB, histamin, putresin, kadaverin dan tiramin ditemukan sebagai AB paling penting yang terkait dengan pembusukan makanan dan keracunan makanan apabila dikonsumsi secara berlebihan [5]. Perlu dicatat bahwa histamin merupakan AB yang bisa dengan mudah ditemukan di dalam makanan yang mengandung protein terutama pada ikan dan produknya. Keracunan AB yang disebabkan oleh histamin juga dikenali sebagai “*Scombroid poisoning*” atau keracunan histamin, ini disebabkan karena keracunan ini terkait dengan konsumsi ikan dari keluarga *Scombridae* dan *Scomberesocidae* (*tuna, mackerel, bonito, bluefish, dll.*) yang mengandung histamin yang sangat tinggi. Spesies ini mengandung asam amino bebas yaitu histidin di dalam jaringan otot mereka, yang didekarboksilasi menjadi histamin. Namun, spesies non scombroid lainnya juga mengandung histamin bebas tingkat tinggi di jaringan otot mereka [6], itulah sebabnya penyakit ini kemudian dikenal sebagai “keracunan histamin”. Gejala keracunan histamin menjadi perhatian oleh peneliti disebabkan ia dapat menyerang berbagai sistem yang berbeda seperti kardiovaskular, gastrointestinal dan pernapasan, gangguan – gangguan pada sistem ini meliputi tekanan darah rendah, iritasi kulit, sakit kepala, edema, dan ruam khas reaksi alergi [7]. Selanjutnya, histamin berperan dalam masalah kesehatan yang dikenal sebagai

histaminosis atau intoleransi histamin yang terkait dengan peningkatan histamin dalam plasma darah. Penting juga untuk menunjukkan bahwa histamin adalah mediator gangguan alergi [8]. Dengan semua alasan yang telah dikemukakan, histamin menjadi AB yang menjadi perhatian utama dalam kimia klinis dan makanan. Namun, beberapa peneliti juga telah mengungkapkan bahwa histamin bukan satu-satunya senyawa yang menyebabkan keracunan makanan. Amina lain, seperti putresin dan kadaverin, juga terkait dengan penyakit ini, meskipun keduanya tampaknya memiliki aktivitas farmakologis yang jauh lebih rendah tetapi meningkatkan mereka dapat meningkatkan toksisitas histamin dan menurunkan katabolisme amina ini ketika mereka berinteraksi dengan amina oksidase, sehingga mendukung penyerapan usus dan menghambat detoksifikasi histamin [9].

Ada juga amina biogenik yang terkait dengan keracunan makanan seperti tiramin. Dalam hal ini, keracunannya dikenal sebagai "*cheese poisoning*" karena dikaitkan dengan konsumsi makanan dengan konsentrasi tiramin tinggi, terutama terkait dengan konsumsi keju. Namun, konsentrasi tiramin yang tinggi juga telah ditemukan di dalam daging dan produk daging. Seperti dalam kasus histamin, penyakit ini kemudian dikenal sebagai "*keracunan tiramin*" karena senyawa utama yang terlibat adalah tiramin. Gejala khas keracunan tiramin adalah migrain, sakit kepala, dan peningkatan tekanan darah, karena tiramin memicu pelepasan noradrenalin dari sistem saraf simpatik [10].

Rumusan masalah penelitian ini adalah: 1) Bagaimana memodifikasi bio-polimer poliuretana yang berasaskan minyak sawit menjadi lebih konduktif? 2) Bagaimana mengkombinasikan enzim yang bisa dijadikan sebagai reseptor amina biogenik?, dan 3) Bagaimana perbandingan analisis elektrokimia sensor dengan metode yang sudah ada?

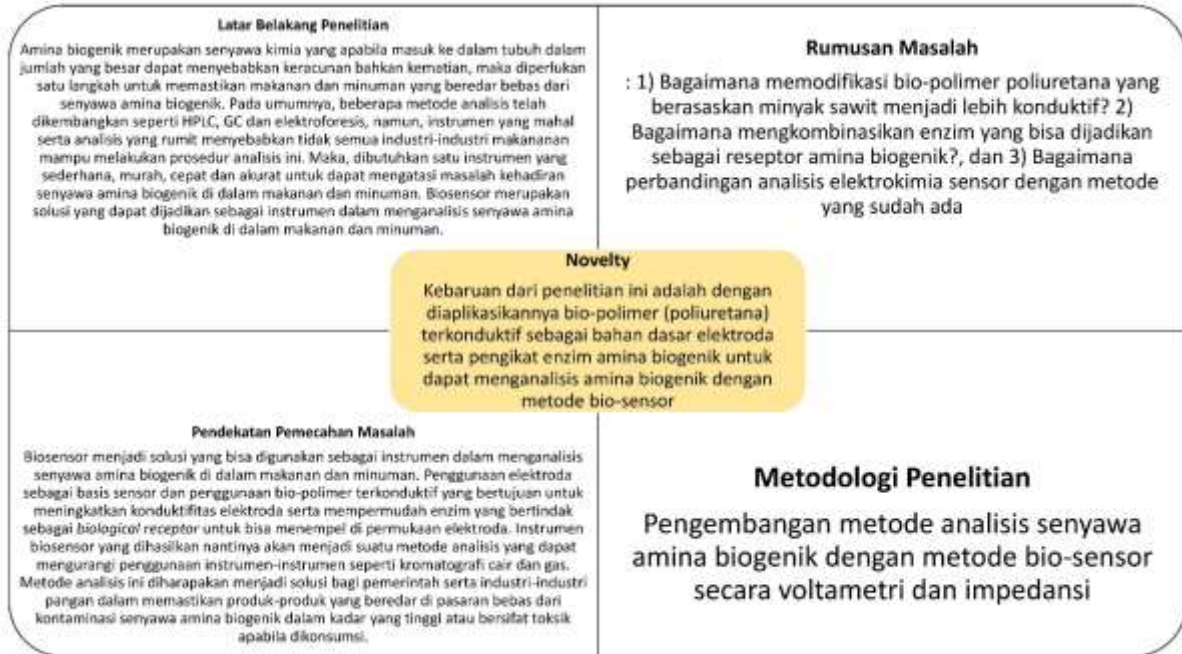
Tujuan Penelitian ini adalah:

1. Menghasilkan film bio-polimer yang dapat menghasilkan konduktifitas yang baik.
2. Menghasilkan kombinasi antara enzim (*biological receptor*) dan polimer.
3. Melakukan modifikasi terhadap elektroda yang digunakan.
4. Dapat menganalisis amina biogenik dengan menggunakan metode biosensor
5. Untuk mendapatkan lebih banyak informasi tentang pembuatan sensor kimia berasaskan film bio-polimer.

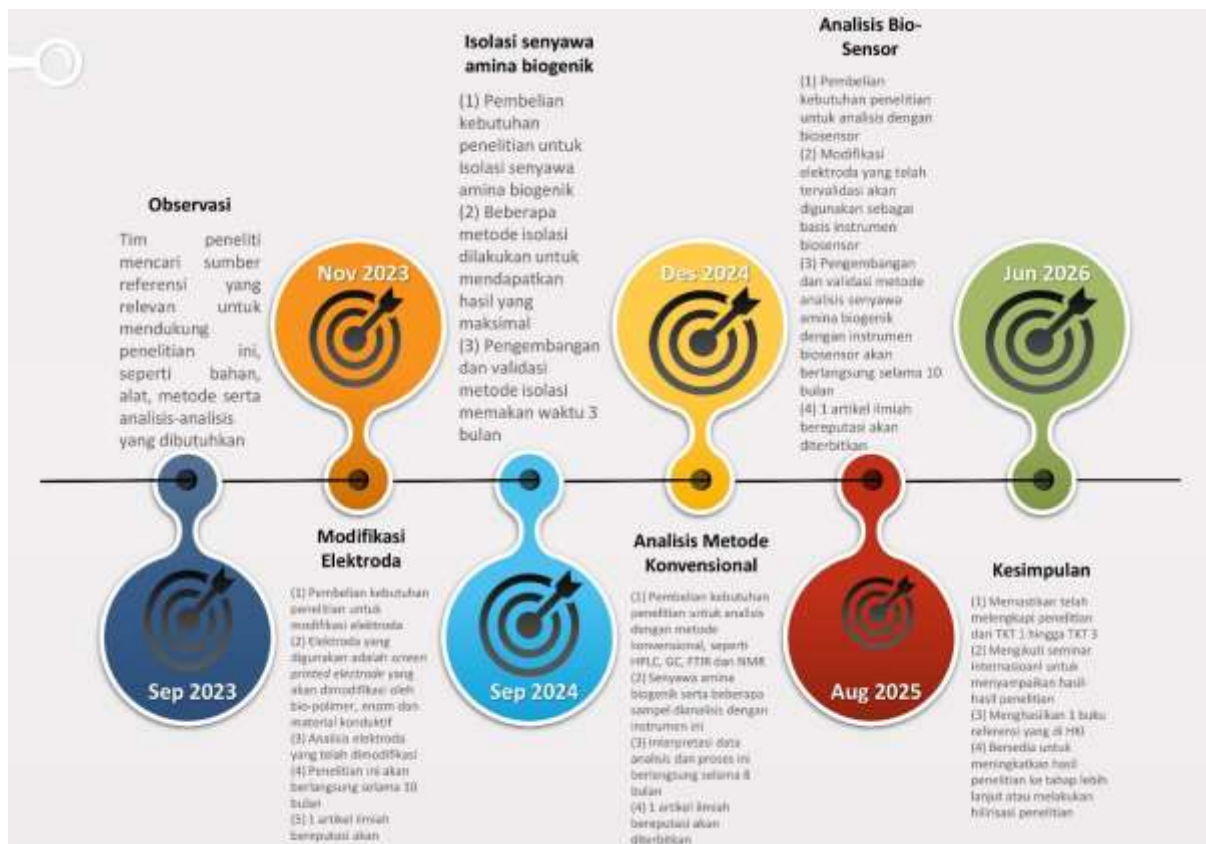
B. Pendekatan pemecahan masalah

Pada umumnya, analisis amina biogenik telah banyak dilakukan dengan berbagai metode analisis seperti metode kromatografi cair & gas, kromatografi lapis tipis serta elektroforesis. Namun beberapa peneliti menyampaikan bahwa penggunaan metode ini sangat lama, memerlukan biaya yang mahal serta harus dioperasikan oleh orang-orang yang memiliki kemampuan dalam bidang analisis. Maka dibutuhkan satu instrumen yang pengoperasiannya mudah, sederhana dan serta murah sehingga peneliti dalam hal ini ingin mengembangkan suatu metode yang dapat digunakan sebagai instrumen analisis. Biosensor menjadi solusi yang bisa digunakan sebagai instrumen dalam menganalisis senyawa amina biogenik di dalam makanan dan minuman. Penggunaan elektroda sebagai basis sensor dan penggunaan bio-polimer terkonduktif yang bertujuan untuk meningkatkan konduktifitas elektroda serta mempermudah enzim yang bertindak sebagai *biological receptor* untuk bisa menempel di permukaan elektroda. Instrumen biosensor yang dihasilkan nantinya akan menjadi suatu metode analisis yang dapat mengurangi penggunaan instrumen-instrumen seperti kromatografi cair dan gas. Metode analisis ini diharapkan menjadi solusi bagi pemerintah serta industri-industri pangan dalam memastikan produk-produk yang beredar di pasaran bebas dari kontaminasi senyawa amina biogenik dalam kadar yang tinggi atau bersifat toksik apabila dikonsumsi.

C. State of the art dan kebaruan



D. Peta jalan (road map) penelitian



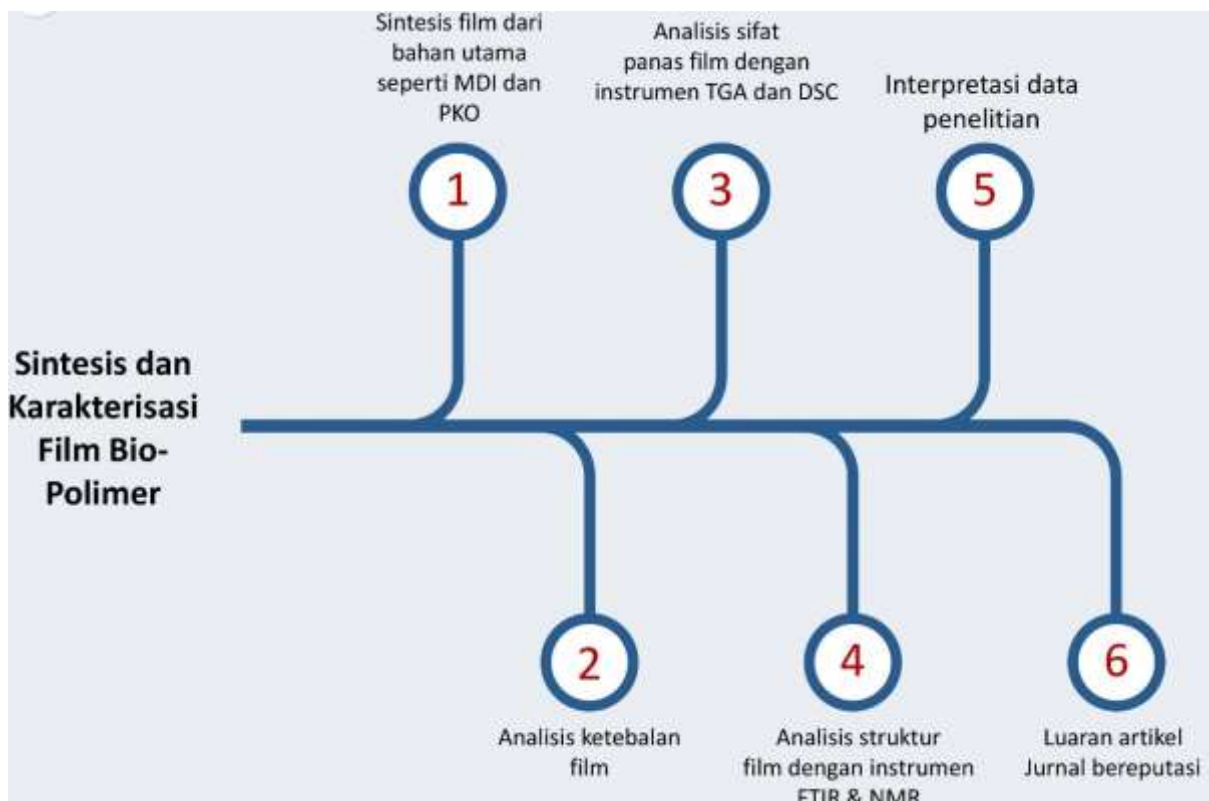
METODA

Metode atau cara untuk mencapai tujuan yang telah ditetapkan ditulis tidak melebihi 1000 kata. Bagian ini dapat dilengkapi dengan diagram alir penelitian yang menggambarkan apa yang sudah dilaksanakan dan yang akan dikerjakan selama waktu yang diusulkan. Format diagram alir dapat berupa file JPG/PNG. Metode penelitian harus dibuat secara utuh dengan penahapan yang jelas, mulai dari awal bagaimana proses dan luarannya, dan indikator capaian yang ditargetkan yang tercermin dalam Rencana Anggaran Biaya (RAB).

Penelitian ini terbagi dalam beberapa tahap metode penelitian.

1. Sintesis dan Karakterisasi Film Bio-Polimer

Di dalam penelitian ini ada beberapa bahan yang dibutuhkan seperti *methylene diphenyl diisocyanate* (MDI), minyak kelapa sawit atau *palm kernel oil* (PKO), polietilenglikol 400 (PEG 400), aseton. Proses pencampuran bahan ini akan terbagi menjadi dua tahapan yaitu, *hard compound* yang akan diwakili oleh MDI dan *soft compound* yang akan diwakili oleh PKO dan PEG 400, manakala aseton akan digunakan sebagai pelarut untuk MDI, PKO dan PEG 400. Perbandingan pelarut juga harus disesuaikan untuk memastikan bahwa film yang dihasilkan nantinya sangat baik dan kuat. Secara garis besarnya, proses ini dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 1. Flowchart sintesis dan karakterisasi film

Dimana setelah pencampuran ketiga senyawa yang ada dilakukan secara homogen, maka larutan harus dituang ke atas permukaan datar dan ditunggu beberapa menit sampai mengering dan membentuk film yang homogen. Reaksi antara senyawa MDI dan PKO akan membentuk film poliuretana.

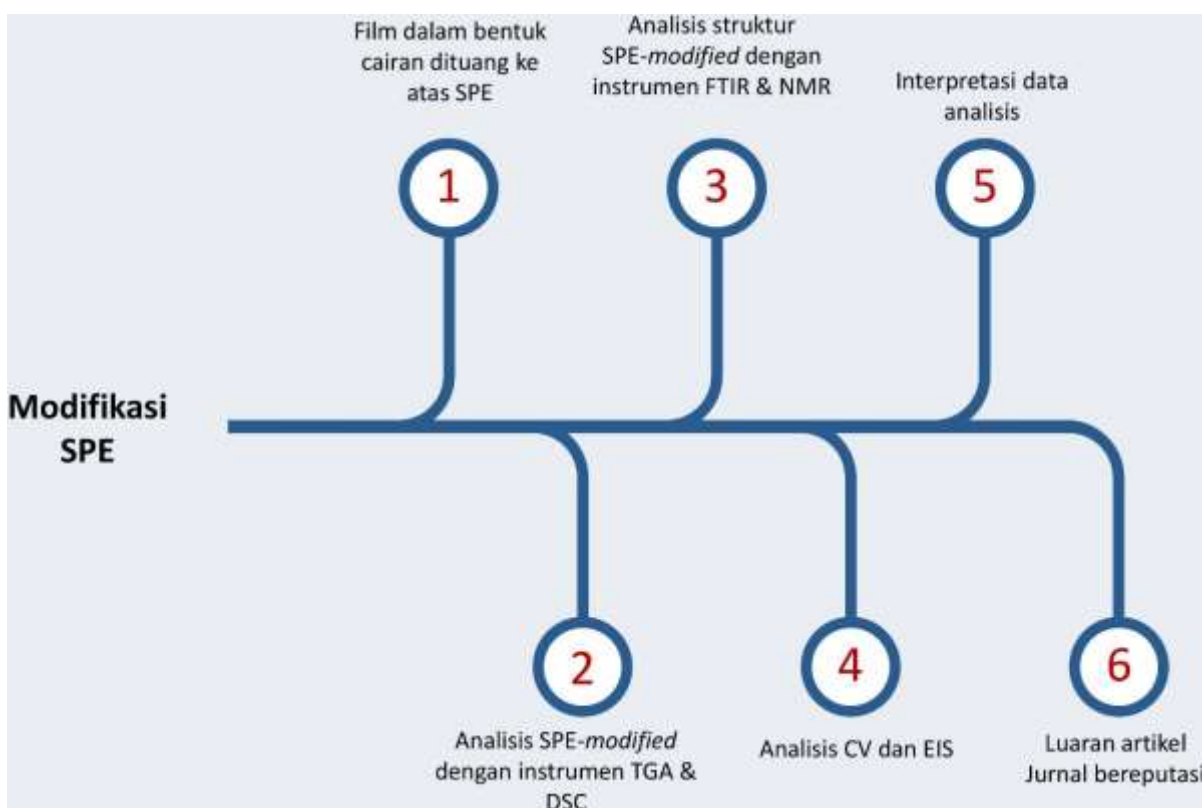
Setelah sintesis film poliuretana (PU) selesai, ada beberapa tahapan yang harus dilakukan untuk mengkarakterisasi film PU tersebut, yaitu:

- Analisis ketebalan film PU,
- Analisis sifat panas (*thermal*) dengan menggunakan instrumen *thermogravimetry analysis* (TGA) dan *Differential Scanning Calorimetry* (DSC),

- Analisis permukaan film PU dengan menggunakan *Field Emission Scanning Electron Microscope* (FESEM),
- Analisis struktur film poliuretana dengan instrumen *Fourier Transform Infrared* (FTIR) dan *Nuclear Magnetic Resonance* (NMR).

2. Modifikasi Elektroda

Di dalam penelitian terkait modifikasi elektroda, bahan dasar yang dibutuhkan ada *screen-printed electrode* (SPE) dari perusahaan Parts Industry, Jakarta. Kemudian, film poliuretana yang masih dalam bentuk cairan dicampur dengan bahan konduktif, dimana di dalam penelitian ini digunakan *graphene oxide* (GO) yang diperoleh dari *Sigma Aldrich* serta enzim *amine oxidase* (AO) yang juga diperoleh dari *Sigma Aldrich*. Senyawa GO dibutuhkan untuk meningkatkan konduktivitas dari SPE, manakala enzim AO digunakan sebagai reseptor yang dapat berikatan dengan senyawa amina biogenik pada saat analisis dilakukan di dalam makanan dan minuman. Untuk memastikan bahwa pembuatan SPE yang dimodifikasi telah berjalan dengan baik, maka diperlukan beberapa proses analisis serta validasi seperti yang tertera pada Gambar 2.



Gambar 2. Flowchart modifikasi dan validasi SPE

Setelah pencampuran antara SPE, GO dan AO dilakukan, maka akan ada beberapa tahapan analisis yang harus dilakukan seperti:

- Analisis sifat panas (*thermal*) dengan menggunakan instrumen *thermogravimetry analysis* (TGA) dan *Differential Scanning Calorimetry* (DSC),
- Analisis permukaan SPE-modified dengan menggunakan *Field Emission Scanning Electron Microscope* (FESEM),
- Analisis struktur SPE-modified dengan instrumen *Fourier Transform Infrared* (FTIR) dan *Nuclear Magnetic Resonance* (NMR),
- Analisis *Cyclic Voltammetry* (CV) dan *Electrochemical Impedance Spectroscopy* (EIS) dengan menggunakan instrumen elektrokimia.

Keempat tahapan analisis ini wajib dilakukan untuk menjamin bahwa elektroda yang telah dimodifikasi dapat digunakan untuk menganalisis senyawa amina biogenik di dalam makanan dan minuman. Untuk data penelitian terkait analisis CV dan EIS, maka perlu dilakukan validasi untuk memastikan bahwa metode biosensor yang digunakan nantinya sudah baik dan dapat diaplikasikan untuk analisis amina biogenik di dalam makanan dan minuman.

3. Isolasi senyawa amina biogenik, analisis konvensional dan analisis biosensor

Pada prosedur ini yang akan dilaksanakan pada tahun ke-3 penelitian, ada beberapa tahapan yang harus dilakukan untuk mencapai TKT-3. Tahap pertama adalah isolasi senyawa amina biogenik yang terdapat di dalam makanan dan minuman. Metode isolasi yang digunakan adalah metode *Ultrasonic Assisted Extraction* (UAE), dimana metode ini diaplikasikan untuk mengekstrak senyawa murni amina biogenik agar dapat dianalisis dengan metode konvensional dan metode biosensor. Pelarut yang digunakan untuk mengisolasi adalah asam trikloroasetil (TCA) yang tentunya dalam penelitian ini akan dilakukan juga validasi terkait konsentrasi TCA yang dianggap paling baik untuk menarik senyawa amina biogenik di dalam makanan dan minuman. Senyawa TCA ini diperoleh dari *Sigma Aldrich*. Manakala beberapa amino biogenik yang digunakan di dalam penelitian ini seperti histamin, kadaverin, tiramin dan putresin akan diperoleh dari *Sigma Aldrich* dengan tingkat kemurnian 99%.

Tahap terakhir adalah analisis senyawa amina biogenik dengan metode konvensional dan metode biosensor dimana instrumen yang digunakan adalah FTIR, HPLC-UV, GC-FID dan GC-MS yang berlokasi di LPPT UGM akan dijadikan sebagai sarana untuk analisis konvensional, manakala analisis dengan metode biosensor akan dilakukan di Laboratorium MIPA, UNS. Data dari kedua metode analisis yang diperoleh nantinya akan divalidasi yaitu:

- *Accuracy*
- *Precision*
- *Reproducibility*
- *Robustness*
- *Recovery study*
- *Limit of Detection*
- *Limit of Quantification*
- Uji pH (biosensor)
- Uji larutan buffer (biosensor)
- Uji konsentrasi GO
- Uji konsentrasi enzim AO
- Uji ketahanan biosensor

Untuk pengujian dengan metode konvensional, beberapa pelarut seperti air suling, metanol dan asetonitril yang diperoleh dari *Sigma Aldrich* akan digunakan sebagai fase gerak dalam instrumen HPLC dan GC. Bahan baku dari amina biogenik juga akan diencerkan dengan tujuan untuk menghasilkan kurva kalibrasi setelah analisis dengan HPLC, GC dan FTIR dilakukan.

Keseluruhan pengujian akan dilakukan pada tahun ke-3 untuk menyelesaikan TKT 3, dan diharapkan hasil dari penelitian ini dapat dikembangkan instrumen biosensor yang sudah tervalidasi dengan baik serta dapat digunakan secara meluas di industri-industri makanan dan minuman yang ada di Indonesia.

JADWAL PENELITIAN

DAFTAR PUSTAKA

Sitasi disusun dan ditulis berdasarkan sistem nomor sesuai dengan urutan pengutipan, mengikuti format Vancouver. Hanya pustaka yang disitasi pada usulan penelitian yang dicantumkan dalam Daftar Pustaka.

- [1] Shkodra, B., Abera, B. D., Cantarella, G., Douaki, A., Avancini, E., Petti, L. & Lugli, P. (2020). Flexible and printed electrochemical immunosensor coated with oxygen plasma-treated SWCNTs for histamine detection. *Biosensors*. 10 (4): 35 – 46.
- [2] Costa, M. P., Rodrigues, B. L., Frasao, B. S., Conte, C. A. (2018). Chapter 2 – Biogenic amines as food quality index and chemical risk for human consumption. *Food Quality: Balancing Health and Disease*. 77 – 108.
- [3] FDA (Food and Drug Administration). Food safety modernization act. (FSMA). Available online: <https://www.fda.gov/food/guidanceregulation/fsma/> (accessed on 28 June 2021).
- [4] CDCP (Centers for Disease Control and Prevention). Available online: <https://www.cdc.gov/foodsafety/index.html> (accessed on 28 June 2021).
- [5] Ruiz – Capillas, C & Herrero, A. M. (2019). Impact of biogenic amines on food quality and safety. *Foods*. 8 (2): 62 – 77.
- [6] Triki, M., Herrero, A. M., Jimenez – Colmenero, F. & Ruiz – Capillas, C. (2018). Quality assessment of fresh meat from several species based on free amino acid and biogenic amine content during chilled storage. *Foods*. 7: 132 – 148.
- [7] Kocoglu, I. O., Erden, P. E. & Kilic, E. (2020). Disposable biogenic amine biosensors for histamine determination in fish. *Analytical Methods*. 12: 3802 – 3812.
- [8] Anderegg, J., Fischer, M., Durig, J., Die, A., Lacroix, C. & Meile, L. (2020). Detection of biogenic amines and tyramine–producing bacteria in fermented sausages from Switzerland. *Journal of Food Protection*. 83 (9): 1512 – 1519.
- [9] Siripongpreda, T., Siralertmukul, K. & Rodthongkum, N. (2020). Colorimetric sensor and LDI – MS detection of biogenic amines in food spoilage based on porous PLA and graphene oxide. *Food Chemistry*. 329: 127165.
- [10] Kanna, S.K., Ambrose, B., Sudalaimani, S., Pandiaraj, M., Gribabu, K. & Kathiresan, M. (2020). A review on chemical and electrochemical methodologies for the sensing of biogenic amines. *Analytical Methods*. 12: 3438 – 3453.
- [11]