

**FABRIKASI APTASENSOR BERBASIS NANOMATERIAL
AU/KITOSAN/GRAFENA OKSIDA TEREDUKSI YANG TERINTEGRASI
POLIMER TERMORESPONSIF UNTUK DETEKSI DINI TROPONIN T PADA
PENYAKIT JANTUNG**

Athika Darumas Putri^{a,b,#}, Bayu Tri Murti^{a,c,#}, Yuliana Purwaningsih^a, Erwin Indriyanti^a,
Eva Oktavia Ningrum^d, Gunawan^e

^aSekolah Tinggi Ilmu Farmasi Yayasan Pharmasi Semarang, Semarang, Indonesia

^bDepartment of Pharmaceutical Sciences, School of Pharmacy, College of Pharmacy,
Taipei Medical University, Taipei, Taiwan

^cGraduate Institute of Biomedical Materials and Tissue Engineering, College of
Biomedical Engineering, Taipei Medical University, Taipei, Taiwan

^dDepartemen Teknik Kimia Industri, Fakultas Vokasi, Institut Teknologi Sepuluh
Nopember, Kampus ITS Sukolilo, Surabaya, Indonesia

^eDepartemen Kimia, Fakultas Sains dan Matematika, Universitas Diponegoro, Semarang,
Indonesia

^ae-mail: athika165@gmail.com

^be-mail: btmt.pharma@gmail.com

^ce-mail: yulianapurwaningsih56@gmail.com

^de-mail: eva-oktavia@chem-eng.its.ac.id

^ee-mail: gunawan@live.undip.ac.id

[#]Correspondence authors

Abstrak

Penyakit jantung (kardiovaskuler) merupakan penyakit tidak menular penyebab kematian utama di Indonesia selain stroke dan diabetes. Infark miokard dikenal sebagai manifestasi penyakit kardiovaskuler yang secara spesifik ditandai dengan peningkatan marker biologis (biomarker) berupa peningkatan kadar protein troponin hingga lebih dari 99% dari batas acuan atas. Dalam penelitian ini, sebuah platform biosensor pintar berbasis nanomaterial grafena oksida tereduksi (rGO), nanopolimer kitosan, terintegrasi polimer termoresponsif (poly(N-isopropylacrylamide); PNIPAM), dan aptamer (aptamer/PNIPAM/rGO/kitosan/Au) telah difabrikasi untuk deteksi dini troponin T. Metode elektrokimia digunakan sebagai pengukuran utama biosensor menggunakan elektroda cetak kerja (*screen printed electrode*) berbasis emas. Hasil menunjukkan bahwa molekul penyusun biosensor telah terdeposisi pada permukaan elektroda kerja (emas)

yang ditunjukkan dengan perubahan transfer muatan (*charge transfer*). Disamping itu, aptamer dapat secara efektif digunakan sebagai molekul pengenalan biomarker troponin T pada biosensor yang telah difabrikasi, yang ditunjukkan dari menurunnya arus (Ampere) pada pengukuran sampel troponin T. Batas deteksi (*limit of detection*) pada penelitian ini diperoleh 6,249 ppm. Biosensor berbasis aptamer dan termoresponsif polimer dapat digunakan sebagai platform deteksi yang sensitif terhadap biomarker troponin T pada penyakit jantung.

Kata Kunci: Aptamer, biosensor, nanomaterial, poly(N-isopropylacrylamide), troponin

T

1. Latar Belakang

Penyakit jantung (kardiovaskuler) merupakan penyakit tidak menular penyebab kematian utama di Indonesia selain stroke dan diabetes. Berdasarkan data dari Survei *Sample Registration* tahun 2014, penyakit jantung koroner (PJK) dinyatakan sebagai penyebab kematian kedua setelah stroke, dengan prevalensi sebesar 12,9 %. Sedangkan menurut hasil Riskesdas (2013), prevalensi tertinggi untuk penyakit kardiovaskuler di Indonesia adalah PJK, yakni sebesar 1,5% (Kementerian Kesehatan Republik Indonesia, 2013). Secara global, sejumlah 17,5 juta orang di dunia meninggal akibat penyakit kardiovaskuler atau sebanding dengan 31% dari 56,5 juta total kematian di seluruh dunia. Lebih dari 3/4 kematian akibat penyakit kardiovaskuler terjadi di negara berkembang termasuk Indonesia. Dari seluruh kematian akibat penyakit kardiovaskuler, 7,4 juta (42,3%) di antaranya disebabkan oleh PJK dan 6,7 juta (38,3%) disebabkan oleh stroke (World Health Organization, 2017).

Infark miokard merupakan manifestasi penyakit kardiovaskuler yang secara spesifik ditandai dengan peningkatan marker biologis (biomarker) troponin hingga lebih dari 99% dari batas acuan atas yang diikuti oleh beberapa patokan tambahan lain misalnya gejala iskemia (Bax *et al.*, 2012). Troponin juga merupakan biomarker jantung yang disarankan oleh *The Third Global Myocardial Infarction Task Force World Health Organisation* (Febriana *et al.*, 2018). Secara struktural, troponin merupakan protein pengatur yang terdapat di filamen tipis apparatus kontraktile otot bergaris, terdiri dari tiga subunit, yaitu troponin T, troponin I, dan troponin C. Protein ini dilepaskan ketika terjadi kerusakan pada otot jantung misalnya pada serangan jantung. Semakin tinggi tingkat kerusakan, maka semakin tinggi jumlah troponin (khususnya T dan I) yang ditemukan dalam darah. Di antara ketiga jenis troponin tersebut, troponin T merupakan biomarker yang paling sering digunakan dalam analisa. Oleh karenanya, deteksi dini biomarker ini merupakan kunci yang efektif dalam rangka pencegahan dan penanganan dini penyakit kardiovaskuler khususnya infark miokard.

Penggunaan biomolekul pengenal dan nanomaterial dalam suatu platform biosensor adalah inti dari selektivitas dan sensitivitas suatu metode deteksi. Dalam penelitian ini, kami mengajukan biosensor aptamer (aptasensor) untuk mendeteksi troponin T berbasis nanomaterial terintegrasi polimer termoresponsif dan kitosan yang dikombinasikan dengan suatu studi komputasi untuk mengetahui interaksi antar molekul

penyusun biosensor. Penggunaan kitosan didasarkan pada sifatnya yang biokompatibel dan mampu meningkatkan sinyal elektrokimia pada konstruksi biosensor (Putri *et al.*, 2017). Penelitian ini mampu menciptakan metode deteksi baru dengan performa yang baik meliputi linearitas dan sensitivitas, disertai dengan studi komputasi *in silico* guna mengkarakterisasi interaksi aptamer dan protein troponin T sebagai target biomarker.

2. Metode Penelitian

Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah alat gelas dalam laboratorium seperti gelas kimia, batang pengaduk, gelas ukur, dan corong gelas, Selain alat gelas, beberapa alat juga digunakan dalam penelitian ini diantaranya sentrifugator, lemari pendingin, ultrasonikator (Branson 1800, USA), dan *magnetic stirrer*. Pengukuran *Fourier-transform infrared spectroscopy* (FTIR; Agilent Technologies Cary 630, USA) dilakukan dengan di Laboratorium Instrumen Stifar “Yayasan Pharmasi Semarang” untuk menganalisis gugus fungsi pada beberapa bahan serta mengkonfirmasi adanya interferensi terhadap bahan tersebut sebelum digunakan untuk konstruksi biosensor. Pengukuran elektrokimia dilakukan di Laboratorium Kimia Analisis Universitas Diponegoro Semarang menggunakan instrumen Core Sell CS-150 potentiostat/galvanostat (China) dengan elektroda *screen printed electrode* (SPE 220AT; DropSens, Methrom, Switzerland). Elektroda kerja (*working electrode*) pada SPE berupa emas (Au), *counter electrode* berupa Au, dan elektroda referensi (*reference electrode*) berupa Ag/AgCl.

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian adalah grafena oksida (GO; Techinstro, India), kitosan (derajat deasetilasi 94,88%; Chimultiguna, Indonesia), polimer poly-(N-isopropylacrylamide), aptamer DNA spesifik troponin T: 5'-NHACGTACCGACTTCGTATGCCAACAGCCCTTTATCCACCTC-3'²⁶ (Integrated DNA Technology, Singapore), protein Troponin T (Novus Biologicals, USA) serta reagen p.a. yang meliputi akuades, akuabidestilata, akuademineralisata, etanol, KH₂PO₄, K₂HPO₄, NaCl, KCl, MgCl₂, K₃[Fe(CN)₆], K₄[Fe(CN)₆] yang diperoleh dari Sigma-Aldrich, USA.

Prosedur Penelitian

Preparasi dan Deposisi Elektrokimia Kitosan pada Elektroda Au

Sebanyak 0,5% kitosan dipreparasi dalam 1% asam asetat dan pH di-*adjust* hingga ~ 5,0. *Screen printed electrode* (SPE) dibilas akuademineralisata tiga kali dan 50 uL larutan kitosan diteteskan pada permukaan ketiga-elektroda selama lima menit.

Preparasi Larutan Aptamer, PNIPAM, rGO, dan Nanokomposit Apt/PNIPAM/rGO

Aptamer troponin T (ujung termodifikasi amino) dilarutkan ke dalam 10 mM PBS pH 7,4 (mengandung 10,0 mM NaCl, 5,0 mM KCl, dan 1,0 mM MgCl₂) dan dihomogenkan hingga larut (konsentrasi final: 15,5 ppm). Larutan didiamkan selama 1 jam, kemudian dialikuot. Larutan aptamer yang tak terpakai disimpan di dalam lemari pendingin dengan suhu 4°C (Jo *et al.*, 2015, Ying *et al.*, 2018).

Sebanyak 50 mg rGO dilarutkan ke dalam 1% sodium lauryl sulfate (SLS) (konsentrasi final rGO: 1 mg/mL). PNIPAM dipreparasi dengan melarutkan PNIPAM hydrogel yang sudah dikeringkan ke dalam akuademineralisata (konsentrasi final: 1 mg/mL). Aptamer 15,5 ppm lalu ditambahkan ke dalam suspensi rGO/PNIPAM dan disonikasi hingga homogen.

Deposisi Komposit rGO, Aptamer, PNIPAM pada Kitosan/Elektroda Au

SPE dibilas dengan akuademineralisata tiga kali sebelum digunakan. Larutan komposit (50 µL) diteteskan di atas kitosan/elektroda Au dan didiamkan selama lima menit, lalu cairan dihapus. Jenis larutan selanjutnya mengikuti sedemikian rupa untuk pengaplikasiannya. Pelaksanaan deposisi ini dilakukan pada suhu ruang. Selain itu, untuk mendapatkan profil individual dari tiap komponen biosensor, komponen diaplikasikan di atas permukaan SPE selama lima menit, kemudian cairan dibilas. Larutan [Fe(CN)₆]³⁻ sebanyak 0,05 M kemudian diaplikasikan setelahnya untuk pengukuran karakter respon elektrokimia masing-masing tersebut (Jo *et al.*, 2015, Ying *et al.*, 2018).

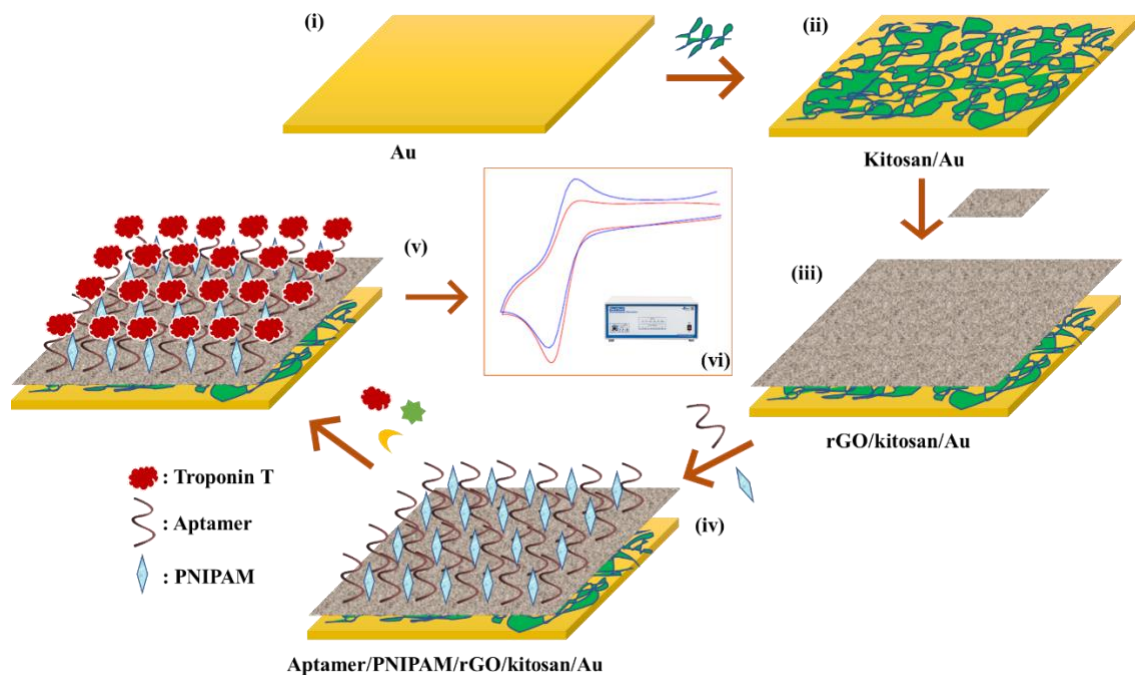
Pengukuran Elektrokimia

Tiga konfigurasi elektroda digunakan: elektroda kerja Au, Ag/AgCl elektroda referensi, dan elektroda *counter* Au. Rentang scan: -0,2 hingga +0,4 V, frekuensi 40 Hz, *scanrate*: 20 mV/s. Pengukuran elektrokimia dilakukan pada suhu ruang selama 30 menit

secara CV. Sebanyak lima konsentrasi larutan (0,1; 0,75; 2,5; 5,0; 10,0 ppm) protein troponin T dipreparasi di dalam larutan 10 mM PBS 7,4 dan masing-masing diaplikasikan pada elektroda termodifikasi di atas (Jo *et al.*, 2015). Adapun rangkaian metodologi terangkum dalam **Gambar 1**.

3. Hasil dan Pembahasan

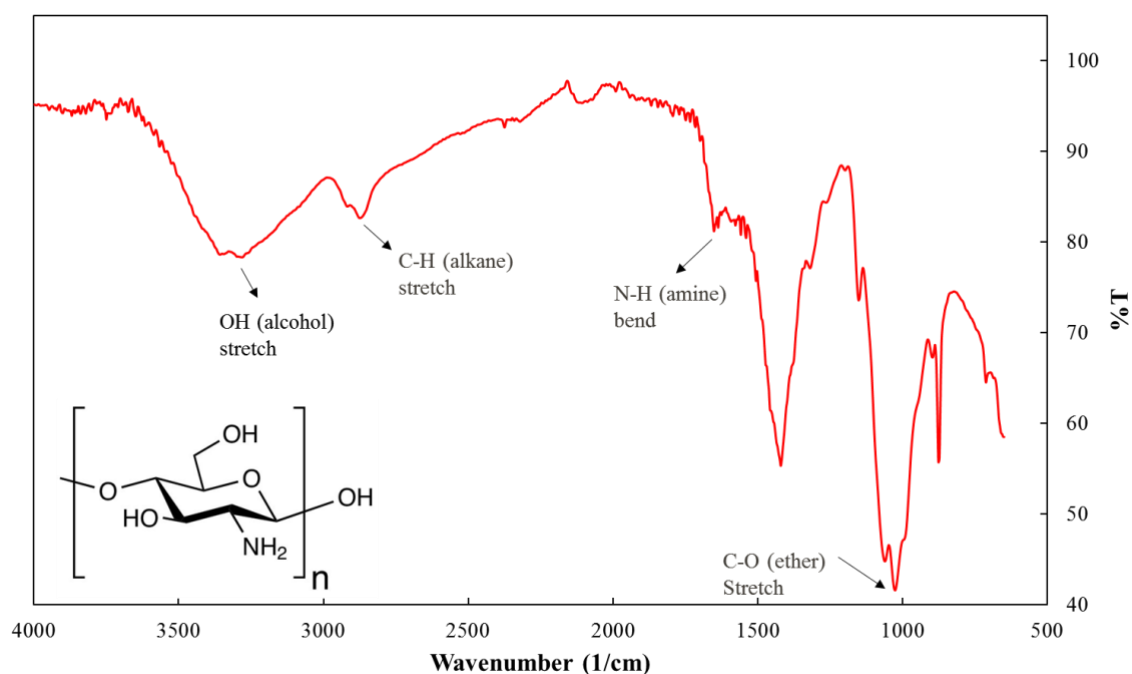
Dalam penelitian ini, konstruksi aptasensor dilakukan dengan deposisi polimer kitosan, grafena oksida tereduksi (rGO), PNIPAM, dan aptamer secara berurutan pada permukaan elektroda kerja emas (Au) (**Gambar 1**). Pada setiap tahap deposisi, dilakukan pengukuran menggunakan metode *cyclic voltammetry (CV)* untuk mengetahui adanya transfer elektron pasca penambahan komponen biosensor.



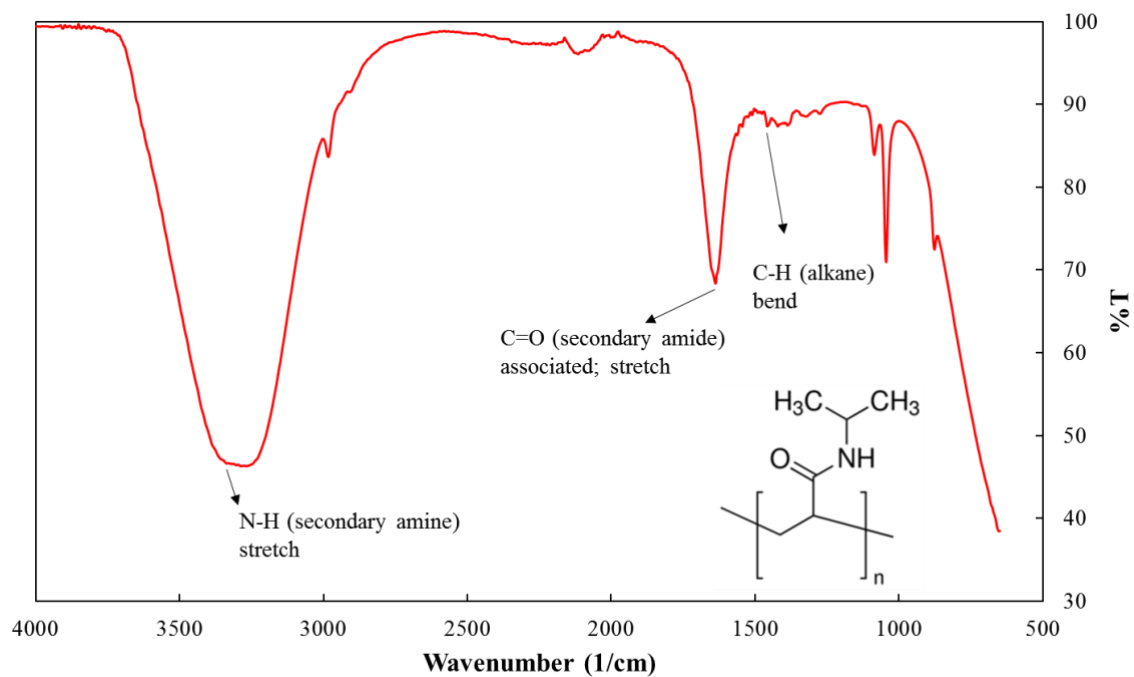
Gambar 1. Tahapan konstruksi biosensor untuk deteksi troponin T secara skematis.

Sebelum melakukan pengukuran elektrokimia, dilakukan karakterisasi material penyusun biosensor menggunakan *Attenuated Total Reflectance (ATR)*-FTIR terhadap kitosan dan PNIPAM. Hasil spektra keduanya ditunjukkan pada **Gambar 2 dan 3**, secara berurutan (untuk kitosan dan PNIPAM). Pada pengukuran ini, digunakan metode ATR-FTIR karena hasil yang lebih akurat dibanding metode konvensional menggunakan pellet KBr, serta kemudahan saat pengoperasian (termasuk saat preparasi sampel/sampling). Pada kitosan, pita lebar terlihat pada bilangan gelombang 3280 cm^{-1} menunjukkan adanya

gugus fungsi OH pada struktur. Di samping itu, beberapa pita lain juga terobservasi diantaranya 2862 cm^{-1} (C-H; alkana), 1651 cm^{-1} (N-H; amina primer), dan 1025 cm^{-1} (C-O; eter) yang bersesuaian dengan gugus fungsi pada struktur kitosan (**Gambar 2; inset**). Hal ini merupakan analisis konfirmasi bahwa material yang digunakan merupakan kitosan murni sekaligus menjelaskan tidak adanya pengotor (interference) pada material penyusun biosensor (Kumirska *et al.*, 2010). Selain itu, pengukuran pada PNIPAM juga menunjukkan hasil yang serupa dengan data analisis IR (*IR assignment*) sebagai berikut: 3328 cm^{-1} (N-H, amina sekunder), 1632 cm^{-1} (C=O, amida sekunder), dan 1457 cm^{-1} (C-H, alkana alifatik) (Qi *et al.*, 2017). Adapun munculnya puncak yang cukup lebar pada area $3000\text{-}3500\text{ cm}^{-1}$ dimungkinkan karena pengaruh pelarut. Spektrum yang dihasilkan pada pengukuran IR telah sesuai dengan gugus fungsi yang terdapat pada struktur PNIPAM (**Gambar 3; inset**).



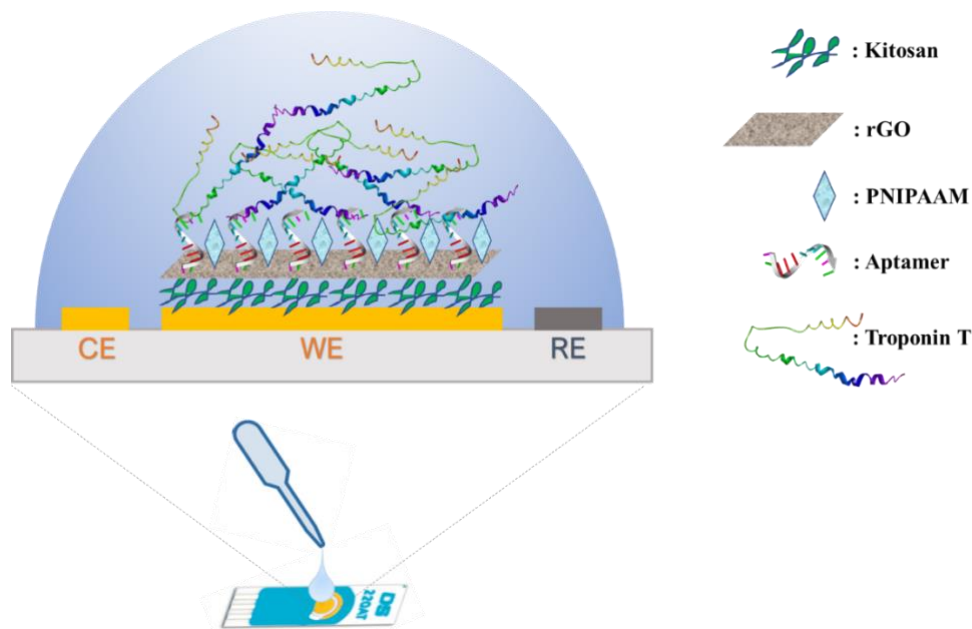
Gambar 2. Spektrum FTIR Kitosan



Gambar 3. Spektrum FTIR PNIPAM

Pengukuran elektrokimia dilakukan menggunakan instrumen potentiostat/galvanostat dengan elektroda *screen printed electrode* (SPE). Elektroda kerja (*working electrode*) berupa Au, *counter electrode* berupa Au, dan elektroda referensi (*reference electrode*) berupa Ag/AgCl. Elektroda yang digunakan adalah *ready to use* dan tidak diperlukan *pre-treatment* sebelumnya. Protokol yang dilakukan adalah berdasarkan cara kerja yang tertera pada metode proposal dengan beberapa penyesuaian.

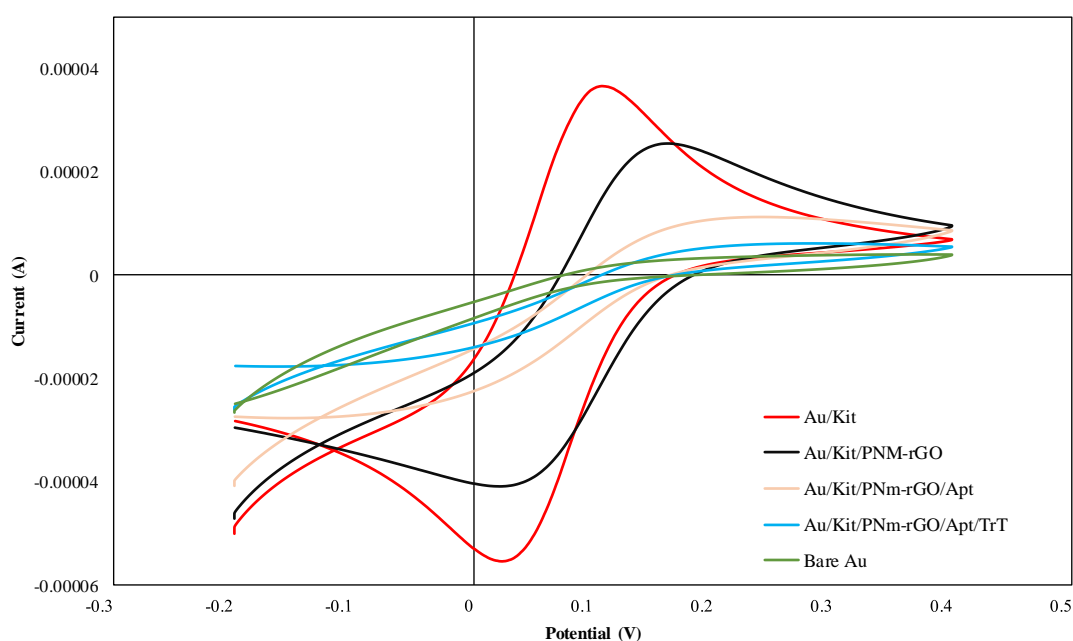
Urutan pengaplikasian komponen biosensor secara berurutan dilakukan dengan deposisi polimer kitosan, rGO, PNIPAM, dan aptamer di atas elektroda kerja Au seperti tertera pada **Gambar 4**. Setiap tahap deposisi larutan dilakukan pengukuran menggunakan metode CV untuk mengetahui adanya transfer elektron pasca penambahan komponen biosensor. Hasil pengukuran (*scanning*) CV ditunjukkan pada **Gambar 5**.



Gambar 4. Skema biosensor elektrokimia untuk deteksi troponin T. Catatan: Gambar tidak berkorelasi dengan ukuran sebenarnya.

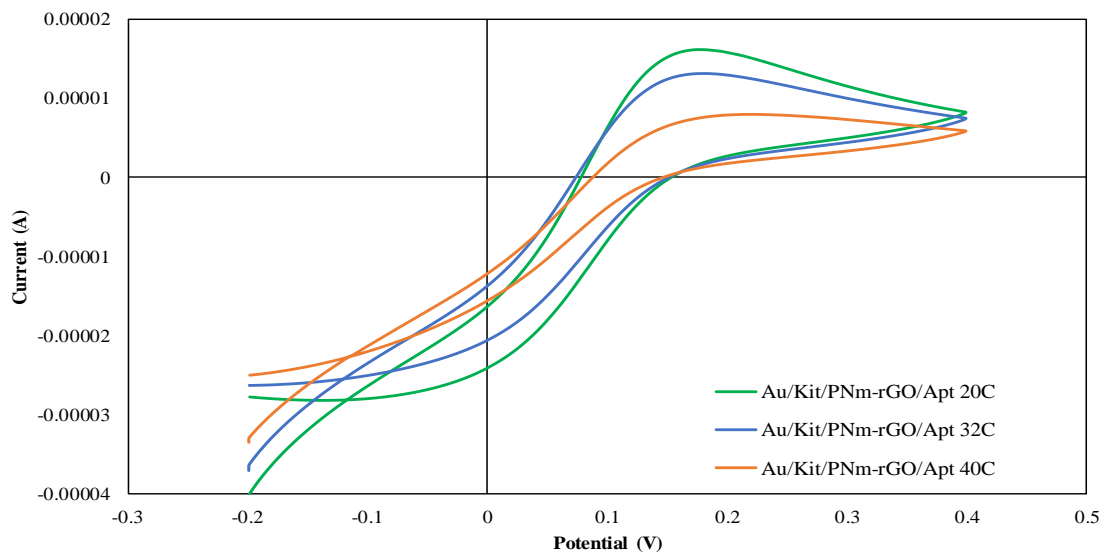
Voltamogram pada **Gambar 5** menjelaskan adanya perbedaan transfer elektron yang terjadi pada deposisi elemen-elemen biosensor pada elektroda Au kosong (*bare*). Intensitas arus pada permukaan elektroda Au individu mengalami peningkatan puncak voltammogram signifikan setelah elektroda kerja Au dideposisi oleh kitosan (Asano *et al.*). Hal ini menunjukkan adanya peningkatan reaksi oksidasi dan juga reduksi yang berkorelasi langsung dengan jumlah elektron transfer antar komposit. Hal ini juga dapat dipahami mengingat Au dan kitosan merupakan dua material yang bersifat kationik sehingga kitosan mampu meningkatkan jumlah elektron yang terdistribusi pada permukaan Au (Au/Kit). Selanjutnya, penambahan komposit PNIPAM-rGO pada bioelektroda (Au/Kit/PNm-rGO) menghasilkan peak voltammogram yang lebih rendah terhadap Au/Kit elemen, mengindikasikan rendahnya transfer elektron yang terjadi pada permukaan Au/Kit/PNm-rGO oleh spesies ferisianid. Hal ini dapat dipahami dari karakteristik fisikokimia elemen terkait bahwa adanya PNIPAM yang merupakan non-konduktif material sehingga lemah dalam mengakomodasi transfer muatan (Song and Hu, 2010, Putri *et al.*, 2019). Arus peak kemudian turun sekitar $17 \mu\text{A}$ dibandingkan dengan modifikasi Au/Kit/PNm-rGO dan Au/Kit setelah penambahan elemen aptamer (Apt) dikarenakan transfer elektron terdisrupsi oleh bioelemen aptamer. Fenomena serupa juga

terindikasi pada modifikasi dengan protein troponin T (TrT) yang berbeda 5 μA dari modifikasi elektroda dengan aptamer. Hal ini dikarenakan bahwa protein, secara komposisi, memiliki ruahan biologis kompleks sehingga pada aplikasinya menghalangi arus elektron pada permukaan bioelektroda. Hasil karakteristik elektroda termodifikasi ini mengindikasikan bahwa aptamer dan protein telah terimobilisasi dengan baik di permukaan elektroda.



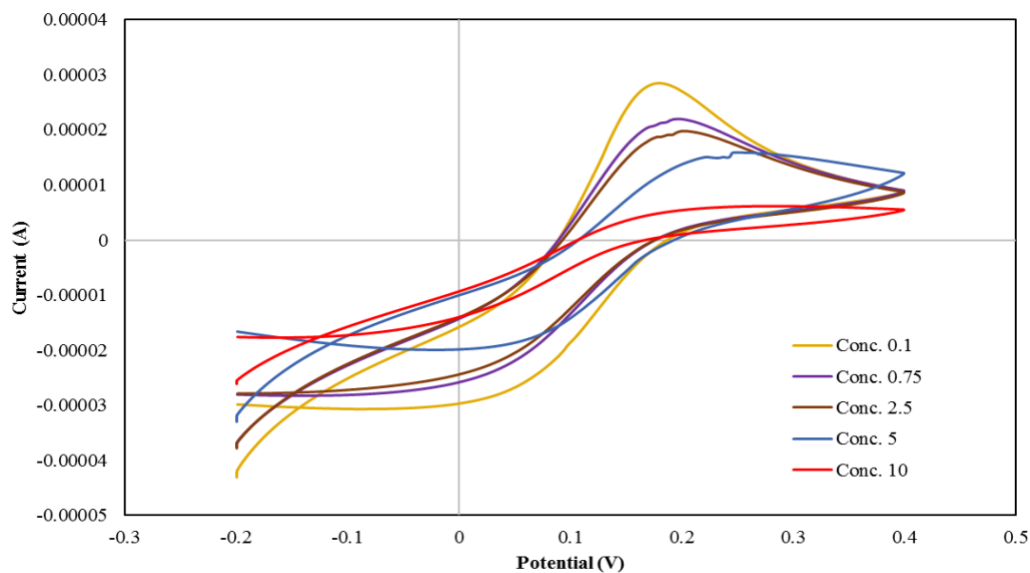
Gambar 5. Cyclic voltammogram biosensor Au/Kit/PNm-rGO/Apt/TrT dalam $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ pada scan rate 20 $\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$

Tahapan berikutnya adalah pengukuran saat PNIPAM dalam suhu di bawah LCST nya, atom N dan O membentuk hydrogen bonding dengan air sehingga memudahkan terjadinya transfer elektron. Sedangkan pada suhu LCST, PNIPAM mulai membentuk hydrogel (ketidaklarutan dalam nuansa akuous) yang semakin sempurna pembentukannya pada suhu 40°C (di atas LCST) (**Gambar 6**).



Gambar 6. Voltamogram PNIPAAm dengan variasi suhu (20, 32, dan 40°C).

Pengukuran seri konsentrasi troponin T dilakukan pada elektroda termodifikasi aptamer Au/Kit/PNm-rGO/Apt (pada hal ini dilakukan pada suhu 32⁰C) (**Gambar 7**). Hasil menunjukkan penurunan arus elektron di tiap kenaikan konsentrasi troponin T yang disebabkan adanya hambatan pada transfer elektron yang terjadi seiring meningkatnya ruahan biologis kompleks dari protein terkait. Adapun *limit of detection* (LOD) yang diperoleh dari pengukuran troponin T menggunakan bioelektroda ini adalah 6,2486 ppm.



Gambar 7. CV Au/Kit/PNm-rGO/Apt/TrT dalam $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ pada scan rate $20 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$ menggunakan konsentrasi troponin T (0,1; 0,75; 2,5; 5,0; 10,0 ppm) selama lima menit pada suhu 32°C .

4. Kesimpulan

Biosensor berbasis aptamer dan termoresponsif polimer dapat digunakan sebagai platform deteksi yang sensitif terhadap biomarker troponin T pada penyakit jantung. Batas deteksi (*limit of detection*) pada penelitian ini diperoleh 6,249 ppm. Aptamer sebagai biomolekul pengenal pada biosensor dapat secara efektif berinteraksi dengan troponin T.

5. Ucapan Terima kasih

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Kementerian Riset dan Pendidikan Tinggi (Dikti) atas bantuan dana melalui skema Penelitian Dosen Pemula dengan nomor kontrak 112/SP2H/LT/DRPM/2019 sehingga penelitian ini dapat berlangsung dan terselesaikan pada waktunya. Penulis juga mengucapkan terima kasih kepada semua pihak yang telah membantu dan berperan selama penelitian dan penulisan artikel ini.

Daftar Pustaka

ASANO, S., SUZUKI, A., ISHII, J., SEKIGUCHI-UEDA, S., SHIBATA, M., YOSHINO, Y., NAKAMURA, K., AKIYAMA, Y., KITAGAWA, F. & SAKUISHI, T. 2012. Use of a new high-sensitivity assay for cardiac troponin T to stratify the risk of cardiovascular disease in outpatients with type-2 diabetes. *Diabetology international*, 3, 29-36.

- BAX, J. J., BAUMGARTNER, H., CECONI, C., DEAN, V., FAGARD, R., FUNCK-BRENTANO, C., HASDAI, D., HOES, A., KIRCHHOF, P. & KNUUTI, J. 2012. Third universal definition of myocardial infarction. *Journal of the American College of Cardiology*, 60, 1581-1598.
- FEBRIANA, S., NURULITA, A. & BAHRUN, U. 2018. Penilaian uji troponin I dengan point of care testing. *Indonesian Journal of Clinical Pathology and Medical Laboratory*, 22, 114-118.
- JO, H., GU, H., JEON, W., YOUN, H., HER, J., KIM, S. K., LEE, J., SHIN, J. H. & BAN, C. 2015. Electrochemical aptasensor of cardiac troponin I for the early diagnosis of acute myocardial infarction. *Anal Chem*, 87, 9869-75.
- KEMENTERIAN KESEHATAN REPUBLIK INDONESIA 2013. Riset kesehatan dasar (Riskesdas) 2013. *Jakarta: Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan*.
- KUMIRSKA, J., CZERWICKA, M., KACZYŃSKI, Z., BYCHOWSKA, A., BRZozowski, K., THÖMING, J. & STEPNOWSKI, P. 2010. Application of spectroscopic methods for structural analysis of chitin and chitosan. *Marine drugs*, 8, 1567-1636.
- LUO, X. L., XU, J. J., ZHANG, Q., YANG, G. J. & CHEN, H. Y. 2005. Electrochemically deposited chitosan hydrogel for horseradish peroxidase immobilization through gold nanoparticles self-assembly. *Biosens Bioelectron*, 21, 190-6.
- PARLAK, O., TURNER, A. P. F. & TIWARI, A. 2014. On/Off-Switchable Zipper-Like Bioelectronics on a Graphene Interface. *Advanced Materials*, 26, 482-486.
- PUTRI, A. D., MURTI, B. T., KANCHI, S., SABELA, M. I., BISETTY, K., TIWARI, A., INAMUDDIN & ASIRI, A. M. 2019. Computational studies on the molecular insights of aptamer induced poly(N-isopropylacrylamide)-graft-graphene oxide for on/off- switchable whole-cell cancer diagnostics. *Scientific Reports*, 9, 7873.
- PUTRI, A. D., MURTI, B. T., SABELA, M., KANCHI, S. & BISETTY, K. 2017. Nanopolymer Chitosan in Cancer and Alzheimer Biomedical Application. *Chitosan: Derivatives, Composites and Applications*, 311-359.
- QI, H., ZHANG, X., JIANG, M., YANG, L. & LI, D. 2017. Optical constants of polyacrylamide solution in infrared spectral region. *Optik*, 146, 27-32.
- SONG, S. & HU, N. 2010. "On-Off" Switchable Bioelectrocatalysis Synergistically Controlled by Temperature and Sodium Sulfate Concentration Based on Poly(N-isopropylacrylamide) Films. *The Journal of Physical Chemistry B*, 114, 5940-5945.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. 2017. *Cardiovascular Diseases (CVDs)* [Online]. Geneva: Organization World Health., Available: [http://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-\(cvds\)](http://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-(cvds)) [Accessed 01 September 2018 2018].
- YING, G., WANG, M., YI, Y., CHEN, J., MEI, J., ZHANG, Y. & CHEN, S. 2018. Construction and application of an electrochemical biosensor based on an endotoxin aptamer. *Biotechnol Appl Biochem*, 65, 323-327.