

# PENCIRIAN ELEKTROKIMIA MENGGUNAKAN KAEDAH PEMEGUNAN DNA YANG BERBEZA UNTUK FABRIKASI BIOSENSOR DNA PORSIN

## *ELECTROCHEMICAL CHARACTERIZATION USING DIFFERENT DNA IMMOBILIZATION METHOD FOR FABRICATION OF PORCINE DNA BIOSENSOR*

Emma Izzati Zakariah<sup>1</sup>, Lee Yook Heng<sup>1</sup>, Haslina Ahmad<sup>2</sup>, Siti Aishah Hasbullah<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Jabatan Sains Kimia, Fakulti Sains dan Teknologi, Universiti Kebangsaan Malaysia, 43600 UKM Bangi, Selangor, Malaysia

<sup>2</sup>Jabatan Kimia, Fakulti Sains, Universiti Putra Malaysia, 43400 UPM Serdang, Selangor, Malaysia

\*Pengarang utama: aishah80@ukm.edu.my

### Abstrak

Beberapa tahun kebelakangan ini, pembangunan sensor asid deoksiribonukleik (DNA) secara elektrokimia telah berkembang dengan pesat. Salah satu langkah penting dalam fabrikasi sensor DNA elektrokimia adalah pemegunan prob DNA pada permukaan elektrod bagi memperoleh proses hibridisasi yang optimum dengan DNA sasaran. Pembinaan biosensor yang mempunyai kepekaan dan selektiviti yang baik memerlukan keberkesanan penghibridan yang tinggi dan meminimumkan penjerapan yang tidak spesifik. Oleh itu dalam kajian ini, pencirian elektrokimia menggunakan tiga kaedah pemegunan DNA berdasarkan lapisan swahimpunan sisteamina, asid 3-merkaptopropionik (MPA) dan matrik mikrosfera akrilik (nBA-NAS) telah di kaji. Antrakuinon-2-asid sulfonik monohidrat (AQMS) digunakan sebagai penanda penghibridan. Kedudukan arus puncak penurunan dan pengoksidaan penanda AQMS adalah pada keupayaan -0.72 V dan -0.66 V. Pengubahsuaian setiap lapisan menggunakan sisteamina, MPA dan nBA-NAS pada permukaan elektrod emas bercetak skrin (Au-SPEs) menunjukkan perubahan arus AQMS yang membuktikan setiap lapisan yang diubahsuaai berjaya dilakukan. Hasil kajian menunjukkan hanya interaksi antara penanda penghibridan AQMS dengan DNA sasaran menggunakan MPA dan nBA-NAS memberikan rangsangan yang baik berbanding dengan sisteamina.

**Kata Kunci:** Biosensor; MPA; sisteamina; mikrosfera akrilik; DNA porsin

### Abstract

In recent years, the interest in developing electrochemical deoxyribonucleic acid (DNA) sensor has been growing. One of the essential step in the fabrication of an electrochemical DNA sensor is DNA probe immobilization on the electrode surface to achieve a good hybridization process with the target of DNA. A biosensor with great sensitivity and selectivity needs high level of hybridization efficiency and minimization of non-specific adsorption. Herein, in this study, three DNA immobilization methods based on cysteamine, 3-mercaptopropionic acid (MPA) and acrylic microsphere (nBA-NAS) were analyzed. Anthraquinone-2-sulfonic monohydrate acid (AQMS) is used as a hybridization label. The reduction and oxidation peak positions of the AQMS markers are at the potential of -0.72 V and -0.66 V. Modifications of each layer using cysteamine, MPA and nBA-NAS on the surface of screen printed gold electrode (Au-SPEs) indicate changes in the current of AQMS that proves modification of each layer was successful. The results show that only the interaction between AQMS markers with DNA target using MPA and nBA-NAS provides a good response compared to the cysteamine.

**Keywords:** Biosensor; MPA; cysteamine; acrylic microsphere; porcine DNA

### Pengenalan

Pemintaan bagi pengesanan asid deoksiribonukleik (DNA) yang lebih cepat, sensitif dan mudah semakin meningkat terutamanya untuk memahami pelbagai proses biologi dan membolehkan pembangunan peranti bioteknologi (Mazlan et al. 2017). Banyak penyelidikan yang telah dilakukan dalam bidang teknologi biosensor kerana aplikasinya yang berpotensi dalam bidang diagnostik klinikal, pemantauan alam sekitar, analisis makanan, industri dadah dan pertanian, pengenalan forensik, dan juga mutasi genetik (Yamanaka et al. 2011). Beberapa tahun kebelakangan ini, terdapat pelbagai pendekatan dalam

pembinaan biosensor DNA dan antaranya ialah pembangunan sensor DNA secara elektrokimia. Biosensor DNA secara elektrokimia adalah biosensor yang menggabungkan penggunaan DNA sebagai elemen pengecam dan elektrod sebagai transduser isyarat elektrokimia. Penghibridan DNA merupakan prinsip utama dalam pembinaan peranti biosensor DNA di mana lapisan prob DNA tunggal (ssDNA) akan dipegunkan pada permukaan elektrod dan kemudian berinteraksi dengan DNA sasaran bagi membentuk heliks ganda dua (Sun et al. 2010; Wang et al. 2015). Penghibridan ini kemudiannya ditukarkan menjadi isyarat kuantitatif oleh transduser sama ada dalam bentuk optik, elektrokimia, piezoelektrik dan haba untuk pengesanan. Transduser elektrokimia telah mendapat perhatian dalam pengesanan DNA kerana kemudahannya dan kaedah pengesanan yang dapat ditukar terus kepada isyarat elektrik (Wang et al. 2011; Ramulu et al. 2013). Teknik elektrokimia yang kebiasaannya digunakan oleh penyelidik ialah transduksi voltammetri siklik (CV) dan voltammetri pembezaan denyutan (DPV) (Halid et al. 2016). Pengesanan DNA secara elektrokimia juga biasanya menggunakan sistem tiga-elektrod konvensional yang terdiri daripada elektrod rujukan, elektrod lawan dan elektrod kerja.

Pemegunan prob DNA pada permukaan elektrod kerja di mana ianya akan mengecam DNA sasaran melalui proses penghibridan merupakan langkah terpenting dalam pembinaan sensor DNA elektrokimia (Xu et al. 2015). Kaedah pemegunan prob DNA yang baik akan meningkatkan kereaktifan pemegunan prob DNA bagi membolehkan hibridisasi dengan DNA sasaran berlaku (Ulianas et al. 2012). Pelbagai kaedah pemegunan DNA dan jenis penyokong telah dilaporkan, antaranya ialah kaedah jerapan, ikatan kovalen, dan tindak balas avidin (atau streptavidin)-biotin (Sassolas et al. 2008). Penyokong boleh diklasifikasikan sebagai organik dan bukan organik bergantung kepada komposisi kimianya, dan ia boleh dibahagikan kepada polimer semula jadi dan sintetik. Penyokong yang paling biasa digunakan adalah karboksimetil-selulosa, kanji, kolagen, sepharose yang diubahsuai, resin pertukaran ion, arang aktif, silica (Wu et al. 2012), tanah liat (Kim et al. 2006), aluminium oksida, titanium, seramik (Datta et al. 2013), agaros (Guisan 2006) atau polimer tertentu (Lee et al. 2009).

Kaedah jerapan adalah kaedah pemegunan prob DNA pada permukaan elektrod yang paling mudah, di mana ianya tidak memerlukan apa-apa reagen kimia atau pengubahsuaian DNA (Pividori et al. 2000). Prob DNA dipegunkan pada permukaan elektrod kerja melalui penjerapan elektrostatik antara kumpulan fosfat DNA yang bercas negatif pada elektrod filem diubahsuai yang bercas positif. Kajian sebelum ini melaporkan bahawa penggunaan kitosan iaitu filem polimer kationik yang digunakan untuk penjerapan prob DNA bertujuan untuk memberikan cas positif yang berketumpatan tinggi dan menghasilkan bioserasi yang baik (Taufik et al. 2011; Qi et al. 2012). Seperti yang dilaporkan Ribeiro et al., elektrod karbon yang telah diubahsuai dengan kitosan direndam di dalam larutan prob DNA ( $3.1 \text{ mg} / \text{mL}^{-1}$ ) dalam larutan penimbal TE selama 2 jam. Kehadiran kumpulan amina bebas ( $\text{NH}_3$ ) polimer kitosan pada permukaan elektrod membolehkan ianya berikatan secara elektrostatik dengan kumpulan fosfat prob DNA yang bercas negatif (Ribeiro Teles et al. 2007).

Tindak balas avidin (atau streptavidin)-biotin merupakan satu lagi kaedah pemegunan prob DNA pada permukaan elektrod. Ini disebabkan oleh molekul biotin yang kecil (berat molekul =  $244.31 \text{ g/mol}$ ) boleh berinteraksi dengan tapak pengikatan avidin/streptavidin dengan afiniti yang sangat tinggi ( $K_a = 1 \times 10^{-15} \text{ M}$ ) iaitu hampir kepada pengikatan kovalen. Oleh itu, ikatan avidin/streptavidin pada molekul biotin adalah sangat stabil dan tahan terhadap suhu, pH, dan pelarut organik (Pividori et al. 2000).

Tidak seperti kaedah penjerapan, kaedah pemegunan DNA melalui ikatan kovalen menunjukkan kestabilan yang baik, fleksibel, kekuatan yang sangat mengikat dan menghalang penyerapan monolayer prob DNA dari permukaan elektrod (Paniel et al. 2013). Selain itu, kaedah ikatan kovalen memberikan orientasi menegak yang baik di mana prob DNA boleh diikat pada permukaan elektrod seterusnya meningkatkan proses penghibridan antara prob DNA dengan DNA sasaran (Wang et al. 2011). Dalam kaedah ikatan kovalen, prob DNA yang disintesis biasanya diubahsuai dengan kumpulan thiol (S-H) atau amina ( $\text{NH}_2$ ) pada tapak 3' atau 5' untuk berikatan secara kovalen pada permukaan logam atau kumpulan fungsi tertentu yang diperkenalkan pada permukaan elektrod. Kaedah ini menyebabkan pengikatan prob DNA spesifik yang tinggi pada permukaan elektrod dan boleh menghalang pengikatan yang tidak spesifik. Penjerapan kimia dan ikatan kovalen sering digunakan dalam pemegunan prob DNA secara kovalen.

Kaedah penjerapan secara kimia sering digunakan dalam pemegunan di antara prob DNA yang diubahsuai dengan thiol dan permukaan emas (Au) yang membentuk pembentukan lapisan swahimpunan (SAM) prob DNA pada permukaan elektrod emas (Benvidi et al. 2015). Ini adalah kerana terdapat interaksi afiniti yang kuat antara kumpulan thiol dan permukaan emas yang membentuk ikatan kovalen emas (Au)-sulfur (S) (Sassolas et al. 2008). Dengan menggunakan prinsip penjerapan secara kimia ini, ikatan Au-S sentiasa dieksploitasi dalam pembinaan biosensor DNA elektrokimia kerana kekuatan mengikatnya yang tinggi, penyediaannya yang mudah, dan sangat stabil (Patel et al. 2012). Penggunaan prob DNA yang diubahsuai dengan  $\text{NH}_2$  yang membolehkan ianya berikatan secara kovalen dengan beberapa bahan terubah suai kumpulan berfungsi pada permukaan elektrod seperti karboksil (Zhang et al. 2013), aldehid (Xu et al. 2015), sulfonik (Wang et al. 2014), epoksi (Li et al. 2008) and isotiosianat (Tan et al. 2015) banyak dilaporkan. Reagen karbodiimida (N-hidroksi suksiimida (NHS) dan 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) karboimida hidroksi klorida (EDC)) biasanya digunakan terutama dalam ikatan kovalen antara kumpulan karboksil dan prob DNA yang diubahsuai dengan kumpulan amina ( $\text{NH}_2$ ). Kumpulan karboksil akan diaktifkan kepada perantara O-asilisourea di mana ianya dapat membuat ikatan mudah dengan kumpulan  $\text{NH}_2$  (Malecka et al. 2014).

Bagi melihat kaedah yang paling sesuai, tiga kaedah pemegunan prob DNA berdasarkan lapisan swahimpunan sisteamina, asid 3-merkaptopropionik (MPA) dan matrik mikrosfera akrilik (nBA-NAS) telah di kaji. Elektrod yang digunakan ialah elektrod emas bercetak skrin (Au-SPEs) dan antrakuinon-2-asid sulfonik monohidrat (AQMS) digunakan sebagai penanda penghibridan. Untuk kaedah pertama, pemegunan prob DNA terubah suai  $\text{NH}_2$  pada Au-SPEs adalah melalui bahan polimer sisteamina yang menggunakan glutaraldehid sebagai pemaui silang. Kaedah kedua pula menggunakan MPA dan kemudiannya pemegunan prob DNA terubah suai  $\text{NH}_2$  berlaku selepas kumpulan karboksilik MPA diaktifkan menggunakan 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) karboimida hidroksi klorida (EDC) dan N-hidroksi suksiimida (NHS). Kumpulan thiol yang diperkenalkan pada kedua-dua kaedah ini membentuk lapisan swahimpunan pada permukaan Au-SPEs melalui ikatan Au-S. Bagi kaedah yang ketiga, mikrosfera polimer akrilik yang diubah suai dengan kumpulan berfungsi suksinimida iaitu nBA-NAS digunakan sebagai matriks untuk pemegunan prob DNA.

### Bahan dan Kaedah

Bahan kimia yang digunakan di dalam kajian ini ialah Asid 3-merkaptopropanoik (MPA), 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) karboimida hidroksi klorida (EDC), N-hidroksi suksiimida (NHS), Sisteamina, glutaraldehid, 2,2-dimetoksi-2-penilasetofenon (DMPP), 1,6-heksanadiol diakrilat (HDDA), Sodium dodesil sulfat (SDS), N-akriloksisuksinimida (NAS), n-butil akrilat (nBA), Antrakuinon-2-asid sulfonik monohidrat (AQMS), DNA sintetik porsin, DNA sasaran, DNA bukan sasaran, didapati daripada Sigma Aldrich, Fluka, System dan Acros. Susunan DNA oligonukleotida adalah seperti berikut:

Prob DNA: 5'- CTGATAGTAGATTTGTGATGACCGTAG(AmC<sub>3</sub>)

DNA sasaran: 5'- CTACGGTCATCACAAATCTACTATCAG

DNA bukan sasaran: 5'- ACGTAACTGCTGTGGCCAGGTCGCTGA

Larutan stok prob DNA (100  $\mu\text{M}$ ) disediakan dalam penimbal 0.05 M K-fosfat (pH 7.0), manakala larutan stok DNA sasaran (100  $\mu\text{M}$ ) disediakan dalam penimbal 0.05 M Na-fosfat (pH 7.0) dan disimpan di bawah suhu  $-20^\circ\text{C}$  apabila tidak digunakan.

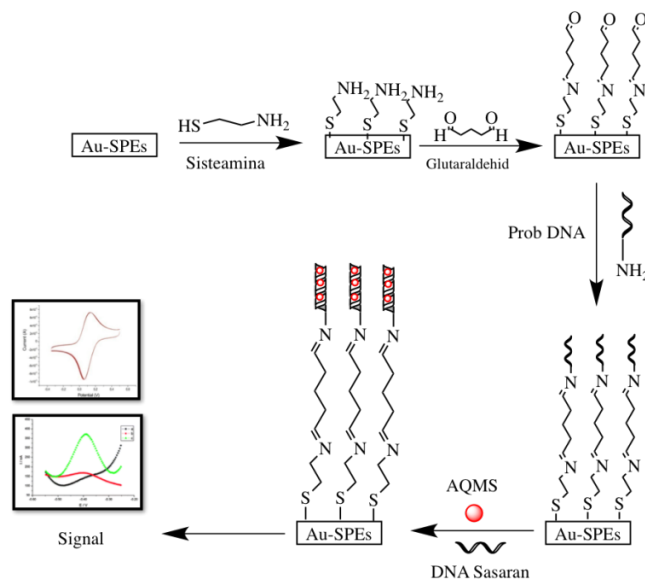
### Pengukuran Elektrokimia

Alat potentiostat voltametri siklik (CV) dan voltametri denyutan pembezaan (DPV) (AutoLab potentiostat) digunakan untuk pengukuran keupayaan biosensor. Elektrod emas bercetak skrin (Au-SPEs) yang digunakan adalah dari DropSens (DRP-C220AT), mempunyai elektrod kerja dan lawan yang diperbuat daripada emas dan elektrod rujukan diperbuat daripada perak. Diameter elektrod kerja ialah 4 mm.

### Fabrikasi Biosensor DNA berdasarkan Lapisan Swahimpunan Sisteamina

Pembentukan lapisan swahimpunan sisteamina pada permukaan Au-SPEs dilakukan dengan mempipet 25 mM larutan sisteamina di dalam pelarut etanol dan dibiarkan selama 4 jam pada suhu  $25^\circ\text{C}$ . Au-SPEs terubahsuai sisteamina (Au-SPEs/Sist.) dibasuh dengan air suling dan larutan 2.5%, glutaraldehid yang

disediakan dalam in 0.1 mol/L PBS, pH 7.0, dipipet ke atas Au-SPEs/Sist. dan dibiarkan selama 1 jam untuk membentuk Au-SPEs terubahsuai sisteamina dan glutaraldehid (Au-SPEs/Sist./Glu.). Kemudian, 3  $\mu\text{M}$  prob DNA dipegunkan ke atas Au-SPEs/ Sisst./Glu. membentuk Au-SPEs/ Sisst./Glu. yang telah terubahsuai dengan prob DNA (Au-SPEs/ Sisst./Glu./Prob) dan di simpan di bawah suhu 4  $^{\circ}\text{C}$  selama sekurang-kurangnya 18 jam. 3  $\mu\text{M}$  DNA sasaran dan 1 mM AQMS pula dipegunkan ke atas Au-SPEs/ Sist./Glu./Prob bagi proses penghibridan berlaku. Kajian CV dan DPV dijalankan dengan menggunakan kadar imbasan 100 mV/s. Kitaran voltametrik siklik diimbas pada julat keupayaan -0.10 V hingga 0.20 V. Rajah 1 menunjukkan mekanisme rekabentuk biosensor DNA berdasarkan lapisan swahimpunan sisteamina.

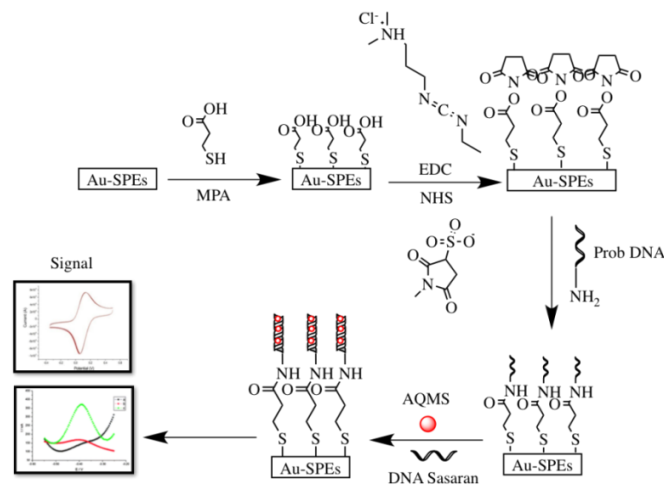


Rajah 1. Mekanisme rekabentuk biosensor DNA berdasarkan lapisan swahimpunan sisteamina

### Fabrikasi Biosensor DNA berdasarkan Lapisan Swahimpunan Asid 3-Merkaptopropanoik (MPA)

Pembentukan lapisan swahimpunan MPA pada permukaan Au-SPEs dilakukan dengan mempipet larutan 20 mM MPA di dalam pelarut etanol dan dibiarkan semalaman untuk menghasilkan lapisan karboksil pada Au-SPEs. Au-SPEs terubahsuai MPA (Au-SPEs/MPA) dibasuh dengan etanol untuk mengeluarkan molekul MPA yang berlebihan, dan larutan pengaktifan yang mengandungi EDC, 2 mM dan NHS, 5 mM dipipet, dan dibiarkan selama 2 jam bagi membentuk Au-SPEs yang terubahsuai dengan MPA/EDC/NHS (Au-SPEs/MPA/EDC/NHS).

Kemudian, 3  $\mu\text{M}$  prob DNA dipegunkan ke atas Au-SPEs/MPA/EDC/NHS dan di simpan di bawah suhu 4 $^{\circ}\text{C}$  selama sekurang-kurangnya 18 jam bagi membentuk Au-SPEs/MPA/EDC/NHS yang telah terubahsuai dengan prob DNA (Au-SPEs/MPA/EDC/NHS/Prob). 3  $\mu\text{M}$  DNA sasaran dan 1 mM AQMS kemudiannya dipegunkan ke atas Au-SPEs/MPA/EDC/NHS/Prob bagi proses penghibridan dengan prob DNA berlaku. Kajian CV dan DPV dijalankan dengan menggunakan kadar imbasan 100 mV/s. Kitaran voltametrik siklik diimbas pada julat keupayaan -0.10 V hingga 0.20 V. Rajah 2 menunjukkan mekanisme reka bentuk biosensor DNA berdasarkan lapisan swahimpunan 3-Merkaptopropanoik (MPA).

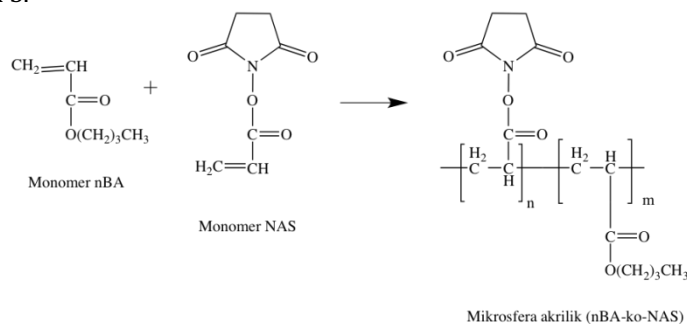


Rajah 2. Mekanisme rekabentuk biosensor DNA berdasarkan lapisan swahimpunan 3-Merkaptopropanoik (MPA)

### Fabrikasi Biosensor DNA Menggunakan Mikrosfera Akrilik sebagai Tapak Pemegungan Sintesis Mikrosfera Akrilik

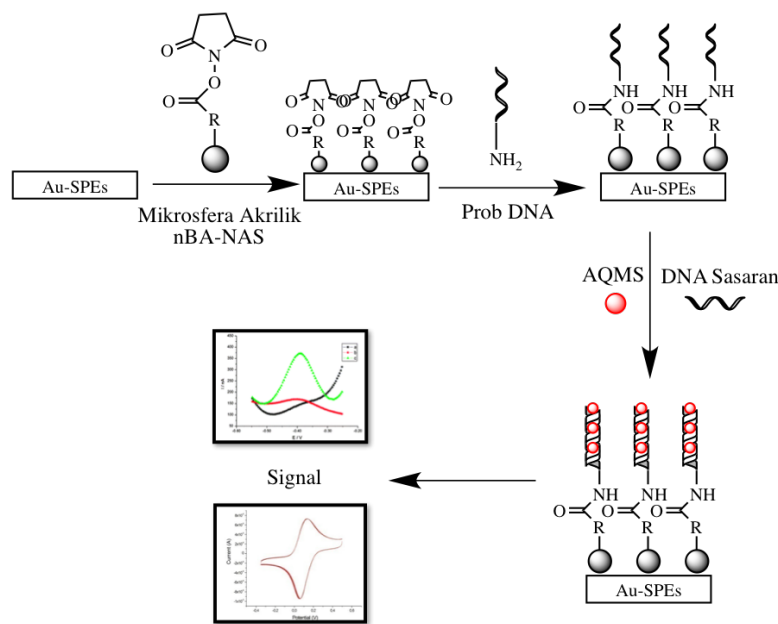
Campuran monomer nBA (7 mL), SDS (0.01 g), HDDA (450  $\mu$ L), DMPP (0.1 g), NAS (6 mg) dan H<sub>2</sub>O (15 mL) disonikasi selama 10 minit. Larutan emulsi yang terhasil kemudian didedahkan kepada cahaya UL selama 600s di bawah aliran gas nitrogen yang berterusan. Mikrosfera poli (nBA-NAS) yang dibentuk kemudiannya dikumpulkan dengan mengempar pada 4,000 rpm selama 30 minit dan kemudian dibasuh tiga kali dalam penimbal 0.05 M K-fosfat (pH 7.0), diikuti oleh pengeringan udara (Ulianas et al. 2012).

Monomer n-butyl akrilat (nBA) yang bersifat hidrofobik dipilih sebagai bahan pembentuk polimer. N-akriloksisuksinimida (NAS) mempunyai kumpulan berfungsi suksinimida membolehkan ianya diubahsuai dengan monomer nBA untuk membentuk mikrosfera akrilik (nBA-ko-NAS). Monomer nBA antara salah satu bahan yang telah banyak digunakan dalam sintesis polimer yang berbentuk membran (Sharina et al. 2008). Disebabkan sifat nBA yang tidak larut air dan tidak memerlukan pemplastik, sintesis boleh difoto rawat dan mempunyai nilai suhu peralihan kaca (T<sub>g</sub>) yang rendah menyebabkan ianya mudah melekat kepada elektrod. Sifat ini menyebabkan monomer nBA dipilih sebagai bahan reka bentuk mikrosfera akrilik. Sifat nBA yang tidak larut dalam air membolehkan nBA membentuk emulsi dalam air. NAS boleh berikatan kovalen dengan kumpulan amina kerana ia mempunyai kumpulan berfungsi suksinimida (Ulianas et al. 2012). Monomer nBA boleh membentuk ko-polimer sebagai mikrosfera akrilik dengan NAS kerana NAS mempunyai ikatan ganda dua karbon-karbon (C=C). Sifat yang terdapat pada nBA dan NAS ini menjadikan ianya digunakan sebagai bahan asas untuk merekabentuk mikrosfera dan menghasilkan mikrosfera yang mempunyai kumpulan aktif untuk bertindak balas dengan kumpulan amina dan mudah lekat kepada elektrod. Mekanisme tindak balas pembentukan mikrosfera ko-polimer akrilik daripada monomer n-butyl akrilat (nBA) dan N-akriloksisuksinimida (NAS) adalah seperti yang ditunjukkan pada Rajah 3.



Rajah 3. Mekanisme tindak balas pembentukan mikrosfera akrilik daripada monomer nBA dan monomer NAS

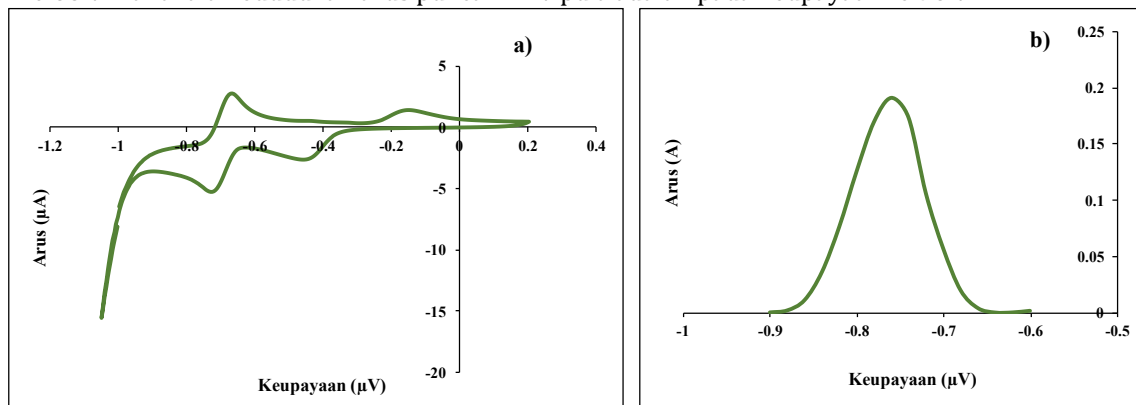
Elektrod emas bercetak skrin (Au-SPEs) diubahsuai dengan melakukan pemendapan 1mg mikrosfera poli(n-butylakrilat-N-akriloksisuksimida) ke atas Au-SPEs bagi membentuk Au-SPEs yang terubahsuai dengan mikrosfera (Au-SPEs/nBA-NAS). Kemudian, 3  $\mu\text{M}$  prob DNA dipegunkan ke atas Au-SPEs/nBA-NAS dan di simpan di bawah suhu 4°C selama sekurang-kurangnya 18 jam bagi memebentuk Au-SPEs/nBA-NAS yang telah terubahsuai dengan prob DNA (Au-SPEs/nBA-NAS/Prob). 3  $\mu\text{M}$  DNA sasaran dan 1 mM AQMS kemudiannya dipegunkan ke atas Au-SPEs/nBA-NAS/Prob bagi membolehkan proses penghibridan berlaku. Kajian CV dan DPV dijalankan dengan menggunakan kadar imbasan 100 mV/s. Kitaran voltametrik siklik diimbis pada julat keupayaan -0.10 V hingga 0.20 V. Rajah 4 menunjukkan mekanisme rekabentuk biosensor DNA menggunakan mikrosfera akrilik sebagai tapak pemegun.



Rajah 4. Mekanisme rekabentuk biosensor DNA menggunakan mikrosfera akrilik sebagai tapak pemegun

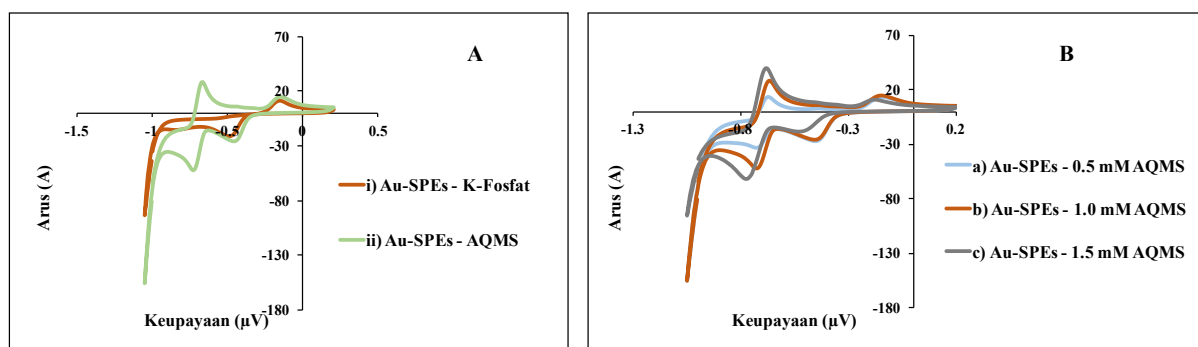
### Keputusan dan Perbincangan

Voltametri berkitar (CV) dan voltametri denyutan pembezaan (DPV) penanda 1.0 mM AQMS adalah seperti yang ditunjukkan pada Rajah 5. CV dan DPV direkodkan dengan menggunakan Au-SPEs. Kedudukan arus puncak penurunan dan pengoksidaan CV penanda AQMS adalah pada keupayaan -0.72 V dan -0.66 V manakala kedudukan arus puncak DPV pula adalah pada keupayaan -0.76 V.



Rajah 5. CV (a) dan DPV (b) larutan bahan redoks AQMS 1 mM dalam 0.05 M penimbal K-fosfat pada pH 7.0 pada kadar imbasan 0.10 V/s

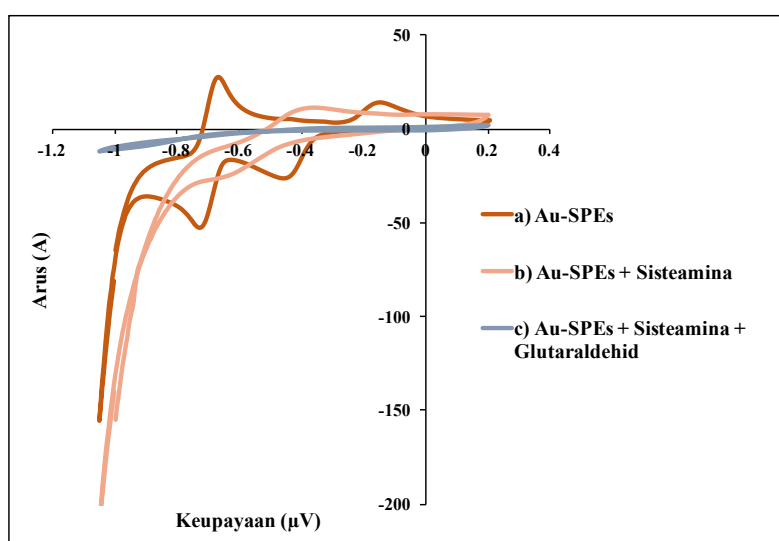
Kedudukan arus puncak penurunan dan pengoksidaan penanda AQMS ini tidak sama seperti yang dilaporkan oleh Wong & Gooding (Wong & Gooding 2006) iaitu pada keupayaan  $-0.54$  dan  $-0.45$  V menggunakan elektrod emas konvensional. Walaubagaimanapun, CV penanda AQMS pada kepekatan yang berbeza pada Rajah 6(B) menunjukkan perubahan arus semakin meningkat mengikut kepekatan yang semakin meningkat. Perbezaan perubahan arus penanda AQMS dan penimbal K-fosfat pada Rajah 6(A) juga membuktikan kedudukan arus puncak penurunan dan pengoksidaan penanda AQMS adalah pada keupayaan  $-0.72$  V dan  $-0.66$  V.



Rajah 6. CV Au-SPEs (A) dalam penimbal (i) K-fosfat dan (ii) larutan bahan redoks AQMS 1.5 mM (B) dalam larutan bahan redoks AQMS (a) 0.5 mM, (b) 1 mM dan (c) 1.5 mM, CV Au-SPEs

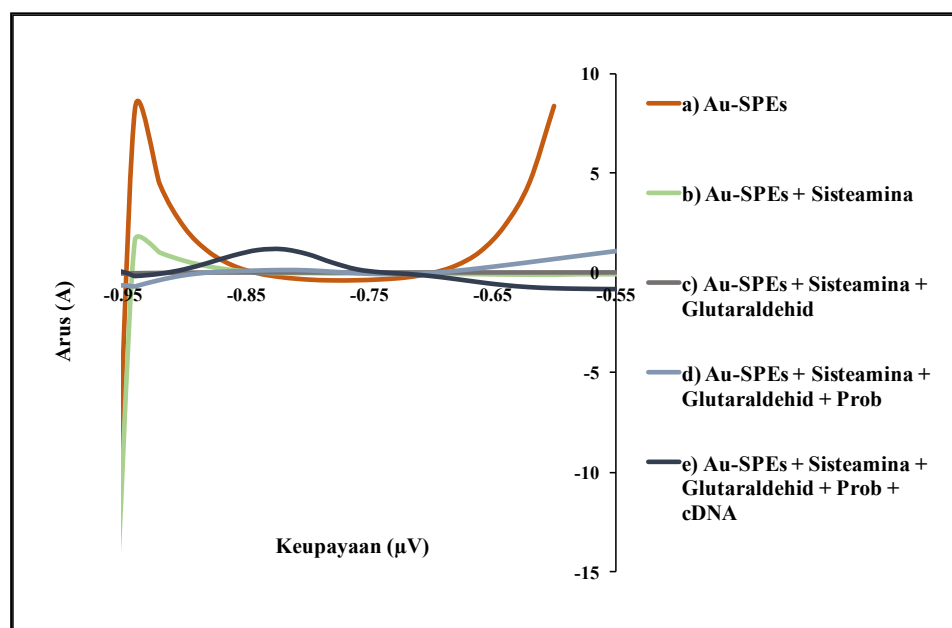
### Pemegungan Prob DNA Berdasarkan Lapisan Swahimpunan Asid 3-Merkaptopropanoik (MPA) dan Sisteamina

Voltamogram berkitar AQMS dengan Au-SPEs terubahsuai dengan sisteamina (Au-SPEs/Sist.) adalah seperti yang ditunjukkan pada Rajah 7. Merujuk kepada rajah 7, arus puncak pada penurunan dan pengoksidaan CV penanda AQMS pada keupayaan  $-0.66$  V dan  $-0.72$  V bagi Au-SPEs terubahsuai sisteamina (Au-SPEs/Sist.) dan Au-SPEs terubahsuai sisteamina dan glutaraldehid (Au-SPEs/Sist./Glu.) iaitu (b) dan (c) tidak kelihatan. Penurunan berturut-turut dalam pemindahan elektron menunjukkan pengubahsuaian Au-SPEs dengan sisteamina dan glutaraldehid berjaya. Lapisan baru yang terbentuk ini bertindak sebagai penghalang dan menyekat pemindahan jisim, seterusnya melindungi penyokong konduktif dan menghalang proses redoks ke atas permukaan elektrod (Chun et al. 2013).



Rajah 7. Voltamogram berkitar AQMS dengan elektrod; Au-SPEs (a), SPE/Sist. (b), Au-SPEs/Sist./Glu.

Rajah 8 menunjukkan rangsangan DPV penanda AQMS pada a) Au-SPEs, b) Au-SPEs/Sist., c) Au-SPEs/Sist./Glu. d) prob DNA beramina, dan e) selepas penghibridan dengan DNA sasaran. Arus puncak DPV penanda AQMS yang ditunjukkan pada prob DNA amina selepas penghibridan dengan DNA sasaran (e) tidak begitu ketara berbanding Au-SPEs terubah suai lain. Ini menunjukkan bahawa proses penghibridan di antara prob DNA amina dengan DNA sasaran tidak berlaku atau hanya sebilangan kecil sahaja yang berlaku. Ini adalah berkemungkinan disebabkan oleh pra-rawatan elektrod tidak dilakukan sebelum fabrikasi.



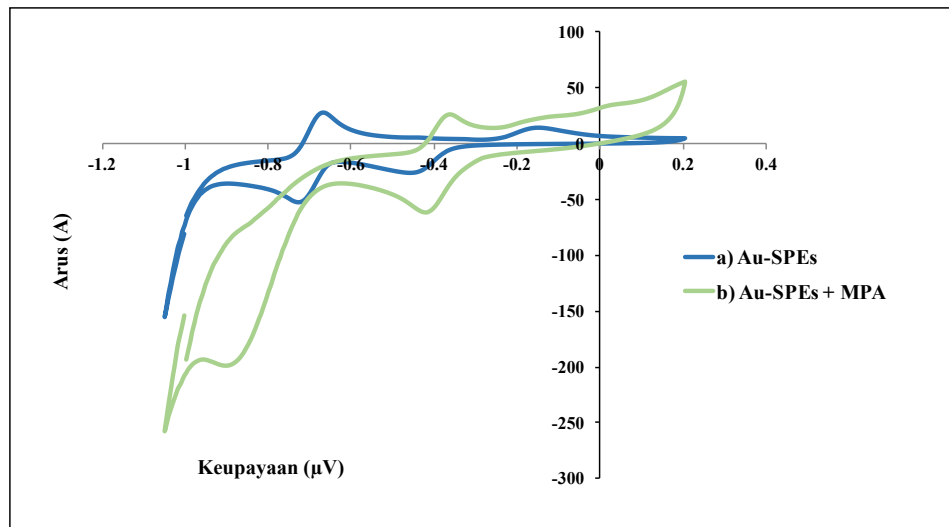
Rajah 8. DPV voltamogram penanda AQMS pada a) Au-SPEs, b) Au-SPEs/Sist., c) Au-SPEs/Sist./Glu. d) prob DNA beramina, dan e) selepas penghibridan dengan DNA sasaran

Bagi sebahagian besar substrat/elektrod, prosedur pembersihan yang teliti dan pra-rawatan elektrod diperlukan sebelum pembentukan lapisan swahimpunan. Terdapat beberapa faktor yang mempengaruhi pembentukan dan ketumpatan pematatan lapisan seperti sifat dan kekasaran substrat, pelarut, sifat bahan yang terjerap, suhu dan kepekatan bahan yang terjerap (Chaki dan Vijayamohanan 2002). Apabila pra-rawatan elektrod tidak dilakukan, berkemungkinan besar pembentukan lapisan yang kurang baik akan berlaku menyebabkan prob DNA tidak dapat berikatan secara kovalen dengan kumpulan aldehid yang terdapat pada glutaraldehyd terutama dalam keadaan orientasi menegak seterusnya mengurangkan kadar proses penghibridan antara prob DNA dengan DNA sasaran.

Pemilihan masa dan kepekatan glutaraldehyd serta perubahan pH pelarut glutaraldehyd juga berkemungkinan menjadi salah satu faktor proses penghibridan tidak berlaku. Kewujudan dua kumpulan berfungsi aldehid pada glutaraldehyd juga mencadangkan pengawasan dalam pemilihan masa, suhu, pH dan kepekatan glutaraldehyd. Ini adalah kerana satu kumpulan berfungsi aldehid yang tidak berubah dijangka perlu kekal sebagai lapisan luar dan sebarang penyimpangan dari keadaan yang dijangka akan menyebabkan pengurangan jumlah karbonil aktif untuk mengikat DNA terubah suai amina seterusnya mengurangkan proses penghibridan dengan DNA sasaran (Moreira et al. 2013).

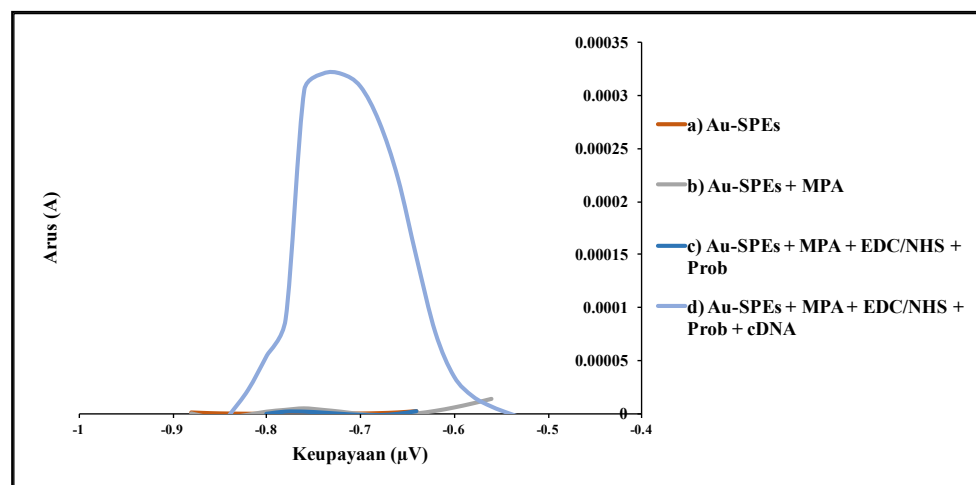
Voltamogram berkitar AQMS dengan Au-SPEs terubahsuai dengan asid 3-merkaptopropionik (Au-SPEs/MPA) adalah seperti yang ditunjukkan pada Rajah 9. Merujuk kepada Rajah 9, arus puncak pada penurunan dan pengoksidaan CV penanda AQMS pada keupayaan -0.66 V dan -0.72 V bagi Au-SPEs terubah suai MPA iaitu (b), tidak kelihatan. Ini adalah kerana, lapisan baru (MPA) yang terbentuk ini bertindak sebagai penghalang dan menyekat pemindahan jisim, seterusnya melindungi penyokong konduktif dan menghalang proses redoks ke atas permukaan elektrod (Chun et al. 2013). Ini juga membuktikan bahawa swahimpunan MPA ke atas Au-SPEs telah berjaya dilakukan.





Rajah 9. Voltamogram berkitar AQMS dengan elektrod; Au-SPEs (a), Au-SPEs/MPA (b)

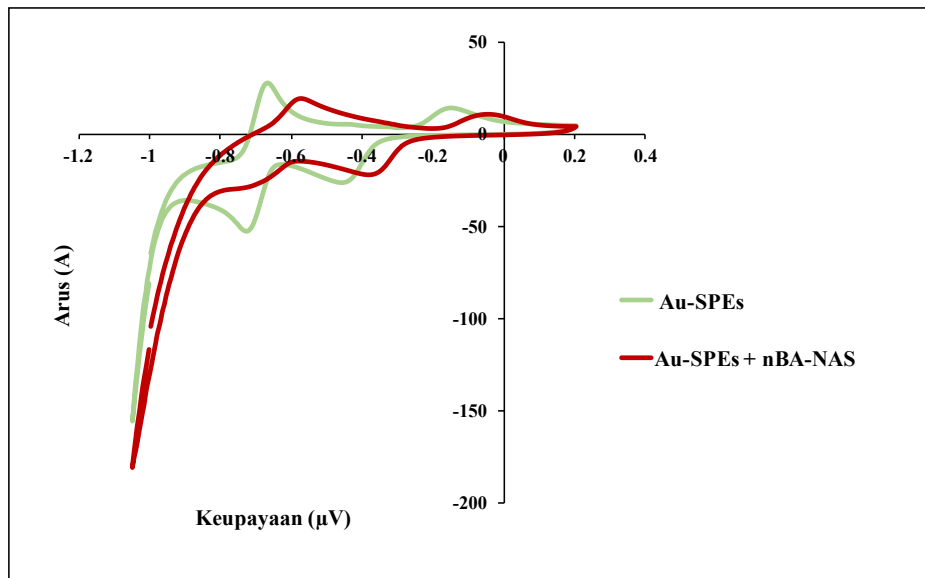
Rajah 10 menunjukkan rangsangan DPV penanda AQMS pada a) Au-SPEs, b) Au-SPEs/MPA, c) prob DNA beramina, dan d) selepas penghibridan dengan DNA sasaran. Arus puncak DPV penanda AQMS yang tinggi ditunjukkan pada prob DNA amina selepas penghibridan dengan DNA sasaran (d) berbanding pada a) Au-SPEs, b) Au-SPEs/MPA, c) prob DNA beramina. Ini menunjukkan telah berlaku penghibridan prob DNA amina dengan DNA sasaran.



Rajah 10. DPV voltamogram penanda AQMS pada a) Au-SPEs, b) Au-SPEs/MPA, c) prob DNA beramina, dan d) selepas penghibridan dengan DNA sasaran

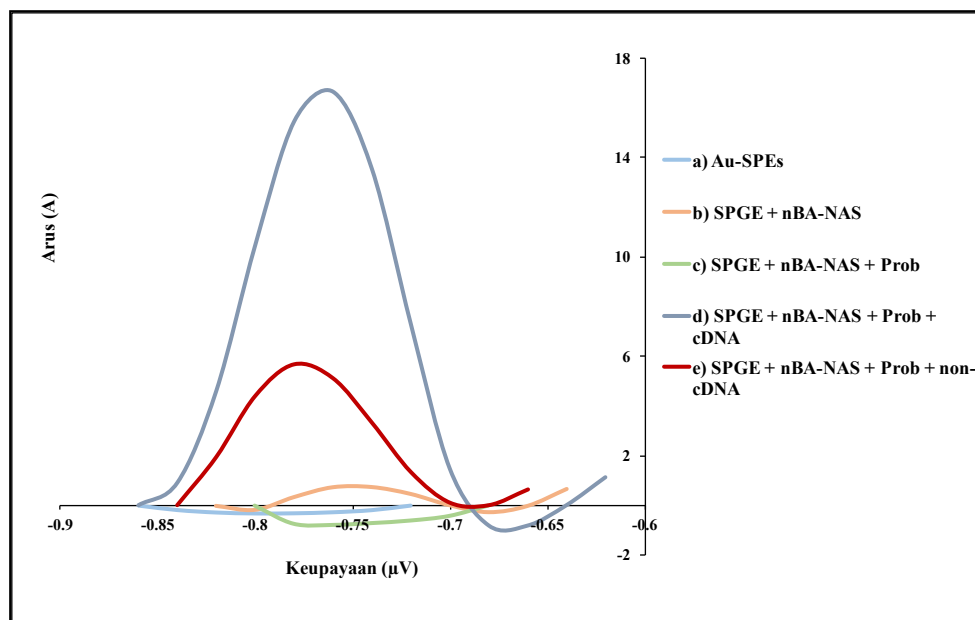
### Pemegunan Prob DNA Menggunakan Mikrosfera Akrilik Pada Permukaan Elektrod Emas Bercetak Skrin (Au-SPEs)

Voltamogram berkitar AQMS dengan Au-SPEs terubahsuai dengan mikrosfera akrilik (Au-SPEs/nBA-NAS) adalah seperti yang ditunjukkan pada Rajah 11.



Rajah 11. Voltamogram berkitar AQMS dengan elektrod; Au-SPEs (a), Au-SPEs/nBA-NAS (b)

Au-SPEs yang diubah suai dengan mikrosfera akrilik memberi kesan terhadap kadar perpindahan elektron. Kadar perpindahan elektron pada Au-SPEs/nBA-NAS (b) lebih lambat berbanding pada Au-SPEs (a). Ini adalah kerana mikrosfera akrilik adalah bahan yang tidak menkonduksi arus, maka pemegunan nBA-NAS pada Au-SPEs boleh menghalang perpindahan elektron kepada elektrod. Hasil kajian ini mendapati Au-SPEs yang diubah suai dengan mikrosfera akrilik (Au-SPEs/nBA-NAS) boleh mengesan AQMS seperti yang dilaporkan oleh Alizar et. al (Ulianas et al. 2012).



Rajah 12. DPV voltamogram penanda AQMS pada a) Au-SPEs, b) Au-SPEs/nBA-NAS, c) prob DNA beramina, d) selepas penghibridan dengan DNA sasaran, e) DNA bukan sasaran

Rajah 12 menunjukkan rangsangan DPV penanda AQMS pada a) Au-SPEs, b) Au-SPEs/nBA-NAS, c) prob DNA beramina, d) selepas penghibridan dengan DNA sasaran, e) DNA bukan sasaran. Arus puncak DPV penanda AQMS yang tinggi ditunjukkan pada prob DNA amina selepas penghibridan dengan DNA sasaran (d) berbanding DNA bukan sasaran (e). Ini menunjukkan telah berlaku penghibridan prob DNA

amina dengan DNA sasaran. Selain itu arus puncak DPV penanda AQMS yang tinggi juga menunjukkan telah berlaku interkalasi penanda AQMS pada DNA bebenang ganda dua (dsDNA). Kebolehan interkalasi AQMS pada dsDNA menggunakan elektrod karbon bercetak skrin (SPE) terubah suai dengan zarah nano emas telah dilaporkan sebelum ini oleh Alizar et al (Ulianas et al. 2012). Terdapat arus DPV yang rendah pada mikrosfera akrilik yang dipegunkan pada Au-SPEs (b) dan selepas penghibridan dengan DNA bukan sasaran (e). Ini berkemungkinan kerana penanda AQMS yang tidak dibilas dengan baik sebelum ujian DPV dijalankan dan terdapat kemungkinan berlaku sedikit jerapan AQMS pada elektrod disebabkan oleh mikrosfera akrilik tidak dipegunkan dengan sempurna pada permukaan elektrod. Arus DPV penanda AQMS yang sangat rendah pada prob DNA amina (c) menunjukkan tidak berlaku interkalasi penanda AQMS kepada prob DNA (ssDNA).

### Kesimpulan

Secara keseluruhannya, hasil kajian menunjukkan bahawa elektrod skrin bercetak emas (Au-SPEs) yang telah terubahsuai dengan mikrosfera akrilik (nBA-NAS) dan asid 3-merkatopropionik (MPA) yang diukur menggunakan voltametri pembezaan denyutan (DPV) adalah sesuai digunakan untuk membangunkan biosensor DNA porsin. Walaubagaimanapun, kajian lanjutan perlu di jalankan bagi memastikan biosensor yang akan di bina adalah lebih sensitif dan selektif. Kajian lanjutan ke atas Au-SPEs yang terubah suai dengan sisteamina juga perlu dijalankan dengan mengambil kira punca atau masalah yang diketengahkan.

### Penghargaan

Pengarang ingin mengucapkan ribuan terima kasih kepada Universiti Kebangsaan Malaysia kerana menyediakan fasiliti penyelidikan. Penyelidikan ini mendapat sokongan dan dana daripada Kerajaan Malaysia melalui Kementerian Pengajian Tinggi melalui geran e-science fund 02-01-02-SF1212 dan FRGS/1/2018/STG01/UKM/02/14.

### Rujukan

- Benvidi, A., Firouzabadi, A. D., Tezerjani, M. D., Moshtaghiun, S., Mazloum-Ardakani, M. & Ansarin, A., 2015, A highly sensitive and selective electrochemical DNA biosensor to diagnose breast cancer, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 750, 57-64.
- Chaki, N. K. & Vijayamohan, K., 2002, Self-assembled monolayers as a tunable platform for biosensor applications, *Biosensors and Bioelectronics*, 17(1-2), 1-12.
- Chun, L., Kim, S.-E., Cho, M., Choe, W.-s., Nam, J., Lee, D. W. & Lee, Y., 2013, Electrochemical detection of HER2 using single stranded DNA aptamer modified gold nanoparticles electrode, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 186, 446-450.
- Datta, S., Christena, L. R. & Rajaram, Y. R. S., 2013, Enzyme immobilization: an overview on techniques and support materials, *3 Biotech*, 3(1), 1-9.
- Guisan, J. M., 2006, Immobilization of enzymes and cells. Ed. 22. Springer.
- Halid, N. I. A., Zakariah, E. I., Heng, L. Y., Karim, N. H. A., Ahmad, H. & Hasbullah, S. A., 2016, Fabrikasi biosensor DNA porsin berasaskan kompleks rutenium bipyridina, *Malaysian Journal of Analytical Sciences*, 20(5), 1020-1032.
- Kim, J., Grate, J. W. & Wang, P., 2006, Nanostructures for enzyme stabilization, *Chemical Engineering Science*, 61(3), 1017-1026.
- Lee, C.-H., Lin, T.-S. & Mou, C.-Y., 2009, Mesoporous materials for encapsulating enzymes, *Nano today*, 4(2), 165-179.
- Li, F., Chen, W. & Zhang, S., 2008, Development of DNA electrochemical biosensor based on covalent immobilization of probe DNA by direct coupling of sol-gel and self-assembly technologies, *Biosensors and Bioelectronics*, 24(4), 781-786.
- Malecka, K., Michalczyk, L., Radecka, H. & Radecki, J., 2014, Ion-channel genosensor for the detection of specific DNA sequences derived from plum pox virus in plant extracts, *Sensors*, 14(10), 18611-18624.
- Mazlan, N.-F., Tan, L. L., Karim, N. H. A., Heng, L. Y. & Reza, M. I. H., 2017, Optical biosensing using newly synthesized metal salphen complexes: A potential DNA diagnostic tool, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 242, 176-188.

- Moreira, F. T., Dutra, R. A., Noronha, J. P., Fernandes, J. C. & Sales, M. G. F., 2013, Novel biosensing device for point-of-care applications with plastic antibodies grown on Au-screen printed electrodes, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 182, 733-740.
- Paniel, N., Baudart, J., Hayat, A. & Barthelmebs, L., 2013, Aptasensor and genosensor methods for detection of microbes in real world samples, *Methods*, 64(3), 229-240.
- Patel, M. K., Solanki, P. R., Khandelwal, S., Agrawal, V. V., Ansari, S. & Malhotra, B., 2012, Self-assembled monolayer based electrochemical nucleic acid sensor for *Vibrio cholerae* detection, *Journal of Physics: Conference Series*, 012009.
- Pividori, M., Merkoci, A. & Alegret, S., 2000, Electrochemical genosensor design: immobilisation of oligonucleotides onto transducer surfaces and detection methods, *Biosensors and Bioelectronics*, 15(5-6), 291-303.
- Qi, X., Gao, H., Zhang, Y., Wang, X., Chen, Y. & Sun, W., 2012, Electrochemical DNA biosensor with chitosan-Co3O4 nanorod-graphene composite for the sensitive detection of *Staphylococcus aureus* nuc gene sequence, *Bioelectrochemistry*, 88, 42-47.
- Ramulu, T., Venu, R., Sinha, B., Lim, B., Jeon, S., Yoon, S. & Kim, C., 2013, Nanowires array modified electrode for enhanced electrochemical detection of nucleic acid, *Biosensors and Bioelectronics*, 40(1), 258-264.
- Ribeiro Teles, F., França dos Prazeres, D. & Lima-Filho, D., 2007, Electrochemical detection of a dengue-related oligonucleotide sequence using ferrocenium as a hybridization indicator, *Sensors*, 7(11), 2510-2518.
- Sassolas, A., Leca-Bouvier, B. D. & Blum, L. J., 2008, DNA biosensors and microarrays, *Chemical reviews*, 108(1), 109-139.
- Sharina, A., Lee, Y. & Musa, A., 2008, Effects of gold nanoparticles on the response of phenol biosensor containing photocurable membrane with tyrosinase, *Sensors*, 8(10), 6407-6416.
- Sun, W., Qin, P., Gao, H., Li, G. & Jiao, K., 2010, Electrochemical DNA biosensor based on chitosan/nano-V2O5/MWCNTs composite film modified carbon ionic liquid electrode and its application to the LAMP product of *Yersinia enterocolitica* gene sequence, *Biosensors and Bioelectronics*, 25(6), 1264-1270.
- Tan, S., Wang, L., Yu, J., Hou, C., Jiang, R., Li, Y. & Liu, Q., 2015, DNA-functionalized silicon nitride nanopores for sequence-specific recognition of DNA biosensor, *Nanoscale research letters*, 10(1), 205.
- Taufik, S., Yusof, N. A., Tee, T. W. & Ramli, I., 2011, Bismuth oxide nanoparticles/chitosan/modified electrode as biosensor for DNA hybridization, *Int. J. Electrochem. Sci*, 6, 1880-1891.
- Ulianas, A., Heng, L. Y., Hanifah, S. A. & Ling, T. L., 2012, An electrochemical DNA microbiosensor based on succinimide-modified acrylic microspheres, *Sensors*, 12(5), 5445-5460.
- Wang, K., Lei, Y., Zhong, G.-X., Zheng, Y.-J., Sun, Z.-L., Peng, H.-P., Chen, W., Liu, A.-L., Chen, Y.-Z. & Lin, X.-H., 2015, Dual-probe electrochemical DNA biosensor based on the "Y" junction structure and restriction endonuclease assisted cyclic enzymatic amplification for detection of double-strand DNA of PML/RAR $\alpha$  related fusion gene, *Biosensors and Bioelectronics*, 71, 463-469.
- Wang, L., Chen, X., Wang, X., Han, X., Liu, S. & Zhao, C., 2011, Electrochemical synthesis of gold nanostructure modified electrode and its development in electrochemical DNA biosensor, *Biosensors and Bioelectronics*, 30(1), 151-157.
- Wang, L., Liao, X., Ding, Y., Gao, F. & Wang, Q., 2014, DNA biosensor based on a glassy carbon electrode modified with electropolymerized Eriochrome Black T, *Microchimica Acta*, 181(1-2), 155-162.
- Wang, Q., Zhang, B., Lin, X. & Weng, W., 2011, Hybridization biosensor based on the covalent immobilization of probe DNA on chitosan-mutiwalled carbon nanotubes nanocomposite by using glutaraldehyde as an arm linker, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 156(2), 599-605.
- Wong, E. L. & Gooding, J. J., 2006, Charge transfer through DNA: a selective electrochemical DNA biosensor, *Analytical chemistry*, 78(7), 2138-2144.
- Wu, C., Zhou, G., Jiang, X., Ma, J., Zhang, H. & Song, H., 2012, Active biocatalysts based on *Candida rugosa* lipase immobilized in vesicular silica, *Process Biochemistry*, 47(6), 953-959.
- Xu, B., Zheng, D., Qiu, W., Gao, F., Jiang, S. & Wang, Q., 2015, An ultrasensitive DNA biosensor based on covalent immobilization of probe DNA on fern leaf-like  $\alpha$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> and chitosan Hybrid film using terephthalaldehyde as arm-linker, *Biosensors and Bioelectronics*, 72, 175-181.
- Yamanaka, K., Saito, M., Kondoh, K., Hossain, M. M., Koketsu, R., Sasaki, T., Nagatani, N., Ikuta, K. & Tamiya, E., 2011, Rapid detection for primary screening of influenza A virus: microfluidic RT-PCR chip and electrochemical DNA sensor, *Analyt*, 136(10), 2064-2068.

Zhang, X., Gao, F., Cai, X., Zheng, M., Gao, F., Jiang, S. & Wang, Q., 2013, Application of graphene-pyrenebutyric acid nanocomposite as probe oligonucleotide immobilization platform in a DNA biosensor, *Materials Science and Engineering: C*, 33(7), 3851-3857.