

## BIOPENDERIA ELEKTROKIMIA BERASASKAN ENZIM ALKALINE FOSFATASE TERPEGUN UNTUK PENGESANAN KETOKSIKAN ASID 2,4-DIKLOROFENOKSIASETIK

Loh Kee Shyuan<sup>1</sup>, Lee Yook Heng<sup>1\*</sup>, Musa Ahmad<sup>1</sup>, Salmah Abdul Aziz<sup>2</sup> & Zamri Ishak<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Pusat Pengajian Sains Kimia & Teknologi Makanan, Fakulti Sains & Teknologi,  
Universiti Kebangsaan Malaysia (UKM), 43600 Bangi, Selangor

<sup>2</sup> Pusat Penyelidikan Bioteknologi, Institut Penyelidikan & Kemajuan Pertanian Malaysia (MARDI),  
P.O. BOX 12301, GPO Kuala Lumpur

\*Corresponding author: yhl1000@ukm.my

### Abstrak

Biopenderia elektrokimia berasaskan pemegungan enzim *alkaline fosfatase* dibangunkan untuk mengesan keracunan pestisid asid 2,4-diklorofenoksiasetik (2,4-D). Biopenderia elektrokimia dibina dengan memegungkan enzim *alkaline fosfatase* pada elektrod bercetak skrin (SPE). Asid askorbik 2-fosfat (AA2P) digunakan sebagai substrak. Pemegungan enzim *alkaline fosfatase* dilakukan dengan pemerangkapannya dalam bahan hibrid sol-gel/kitosan dalam komposisi tertentu. Penentuan ketoksikan pestisid 2,4-D secara analisis kuantitatif dan kualitatif dapat dilakukan melalui perencatan enzim *alkaline fosfatase*. Keupayaan +600mV sesuai digunakan untuk pengoksidaan produk tindak balas enzim-substrak manakala pH yang optimum ialah pH 8.5. Julat rangsangan linear biopenderia untuk kepekatan substrak asid askorbik 2-fosfat ialah 10  $\mu$ M-80  $\mu$ M. Biopenderia 2,4-D menunjukkan perencatan enzim *alkaline fosfatase* adalah maksimum (50% perencatan) pada 80ppm 2,4-D.

**Kata kunci:** Biopenderia elektrokimia, alkaline fosfatase, asid 2,4-diklorofenoksiasetik, sol-gel, kitosan

### Abstract

An electrochemical biosensor based on the immobilisation of alkaline phosphatase was developed for the determination of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D). The biosensor was constructed from the immobilization of alkaline phosphatase enzyme onto a screen-printed electrode (SPE). The ascorbic acid 2-phosphate (AA2P) was used as substrate for the enzymic reaction. The enzyme was entrapped in a hybrid sol-gel/chitosan material with certain fixed composition. The determination of toxicity of 2,4-D pesticides quantitatively and qualitatively could be carried out by the inhibition of the alkaline phosphatase. A potential of +600 mV was suitable to be used for the oxidation of the products from the enzyme-substrate reaction, where the reaction pH was at 8.5. The linear response range of the biosensor to the AA2P substrate was 10  $\mu$ M-80  $\mu$ M. The inhibition of the alkaline phosphatase enzyme of the 2,4-D biosensor was maximum at 80 ppm 2,4-D (50% inhibition).

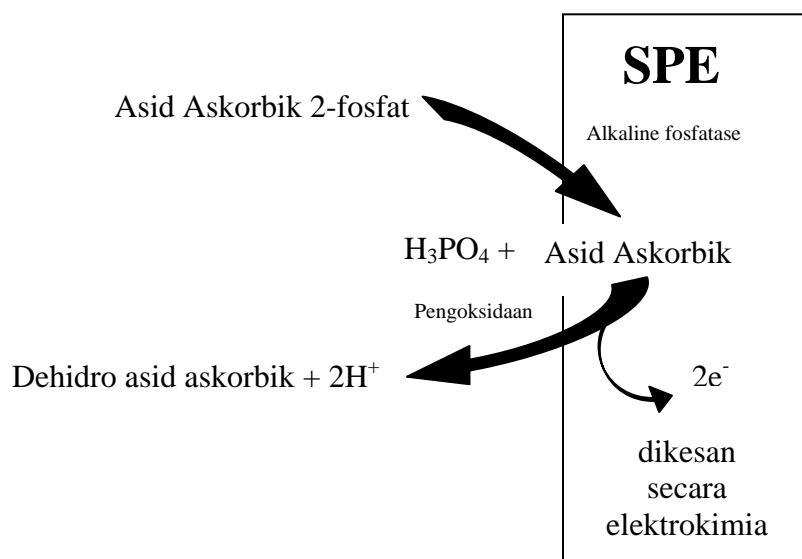
### Pengenalan

Pestisid asid 2,4-diklorofenoksiasetik (2,4-D) merupakan herbisid yang banyak digunakan untuk mengawal tumbuh-tumbuhan berdaun lebar [1]. Herbisid 2,4-D merupakan jenis pestisid dari kumpulan organoklorin yang sukar mengalami biodegradasi dan ia mampu menumpuk dalam lipid lalu tersebar melalui rantai makanan [2]. Penggunaan 2,4-D secara meluas dalam pertanian telah mengakibatkan masalah pencemaran pada sekitaran dan ekosistem, secara langsung ini turut memberi impak yang mengancam kepada manusia [3]. Masalah pencemaran boleh dipantau dengan biopenderia untuk mengesan tahap ketoksikan pestisid dalam air dan sumber makanan.

Biopenderia elektrokimia berasaskan enzim untuk pengesanan pestisid [4-6] dan pengesanan logam berat [7] telah pesat dibangunkan kerana ia dapat bertindak dengan lebih cepat berbanding teknik analisis konvensional. Walaupun kaedah kromatografi gas (GC), kromatografi cecair berprestasi tinggi (HPLC) dan kromatografi gas-spektroskopi jisim (GC-MS) dapat menganalisis sampel pestisid, tetapi cara pemantauan ini memerlukan kos yang tinggi, masa analisis yang lama dan kepakaran dalam pengendalian instrumen. Biopenderia telah mengambil peranan sebagai peranti pelengkap untuk kaedah konvensional. Biopenderia boleh digunakan untuk menjalankan analisis secara *in situ* di lapangan, keboleholungan yang baik dan melibatkan kos yang rendah. Biopenderia berasaskan enzim boleh disediakan melalui pengubahsuaian pada permukaan elektrod dengan pemegungan bahan penderia yang sesuai. Pemegungan enzim pada penyokong lebih baik berbanding enzim dalam larutan bebas kerana enzim bukan sahaja

lebih senang dikendali, malahan dapat memisahkan enzim serta produk hasil secara berasingan dan enzim tersebut dapat diguna semula [8].

Dalam kajian ini, pemegunan enzim alkaline fosfatase dilakukan dengan bahan hibrid sol-gel/kitosan. Kedua-dua bahan ini adalah lengai terhadap biomolekul [9,10] dan enzim dapat dipegun dengan stabil dalamnya tanpa berlaku pengikatan kovalen atau interaksi kimia di antara biomolekul dengan matrik tersebut. Miao dan Tan [11] mendapati biopenderia yang dihasilkan dengan mengguna sol-gel/kitosan sebagai bahan pemegunan memberikan tindak balas yang cepat. Kajian ini menggunakan sistem bioelektrokimia untuk penentuan pestisid 2,4-D secara perencatan enzim. Biopenderia 2,4-D dapat menentukan kehadiran pestisid 2,4-D secara perencatan aktiviti ezim alkaline fosfatase yang terpegun pada elektrod bercetak skrin. (Rajah 1)



Rajah 1: Rajah menunjukkan enzim alkaline fosfatase memangkinkan asid askorbik 2-fosfat kepada asid askorbik, satu spesies elektroaktif yang dapat teroksida pada permukaan elektrod bercetak skrin. Jika pestisid hadir, keaktifan enzim alkaline fosfatase akan terencat dan tindak balas enzim-substrak berkurang dan keamatan arus turut berkurangan.

### Eksperimen

#### Reagen

Bahan-bahan yang digunakan dalam kajian ini adalah tetraetilorthosilikat (TEOS) daripada Fluka, asid hidroklorik dan asid asetik glasial daripada Merck. Kitosan, enzim alkaline fosfatase (AP), asid askorbik-2-fosfat (AA2P), 2,4-diklorofenoksiasetik asid (2,4-D) dan  $MgCl_2$  daripada Sigma, tris(hidroksilmetil) amino metana (Tris-HCl) daripada ICN Biomedical Inc, air nyahion digunakan untuk semua penyediaan larutan.

#### Peralatan

Ujikaji dijalankan dengan menggunakan potensiostat Model AUTOLAB dengan PGSTAT 12 (AUT 71681). Elektrod bercetak skrin (SPE) rekaan UKM diguna sebagai elektrod kerja, elektrod Ag/AgCl diguna sebagai elektrod rujukan dan elektrod platinum diguna sebagai elektrod lawan.

### **Pemegunan enzim alkaline fosfatase dengan hibrid sol-gel/kitosan**

Enzim AP dengan kepekatan tertentu dicampurkan bersama hibrid sol-gel/kitosan untuk pemegunan. Campuran enzim dengan sol-gel/kitosan disalut pada permukaan elektrod bercetak skrin dan dibiarkan untuk pengeringan. Elektrod bercetak skrin terpegun enzim AP kemudian digunakan untuk kajian seterusnya.

### **Ujian hidrodinamik**

Kaedah voltammetri sapuan linear digunakan. Elektrod bercetak skrin yang terpegun dengan enzim AP direndam dalam larutan penimbal Tris-HCl, yang mengandungi  $MgCl_2$ , bersama-sama dengan elektrod rujukan dan elektrod lawan. Larutan penimbal bertindak sebagai elektrolit dan dikacau secara perlahan oleh pengacau magnetik. Kepekatan akhir untuk substrak asid askorbik 2-fosfat ditetapkan pada 80 $\mu$ M. Julat keupayaan 0.2V-0.8V digunakan dalam ujikaji untuk menentukan keupayaan yang sesuai untuk tindak balas enzim AP dengan substrak AA2P. Perubahan arus sebelum dan selepas penambahan substrak AA2P dicatatkan. Ujian hidrodinamik diulangi dengan menggunakan enzim AP dalam larutan bebas untuk membandingkan aktiviti enzim dalam keadaan berlainan yang tidak terpegun.

### **Kesan pH**

Elektrod bercetak skrin terpegun dengan enzim direndam ke dalam larutan penimbal Tris-HCl yang berlainan pH, iaitu pH 4.0 sehingga pH 10.5. Keupayaan untuk ujikaji ini ditetapkan pada +0.6V, iaitu keupayaan yang optimum berdasarkan ujian hidrodinamik dan kepekatan akhir substrak AA2P ditetapkan pada 80 $\mu$ M. Perubahan isyarat arus bagi setiap elektrod bercetak skrin dalam medium pH yang berbeza dibandingkan.

### **Rangsangan enzim AP terhadap substrak AA2P**

Aktiviti enzim AP terhadap substrak AA2P dikaji pada julat kepekatan substrak 10 $\mu$ M-160 $\mu$ M. Elektrod bercetak skrin direndamkan dalam 10.0 ml larutan penimbal Tris-HCl. Arus yang berbeza akan dijalankan dengan kepekatan substrak yang berbeza. Graf kalibrasi biopenderia diplotkan untuk mendapatkan julat rangsangan linear enzim AP terhadap substrak AA2P.

### **Perencatan enzim AP oleh pestisid 2,4-D**

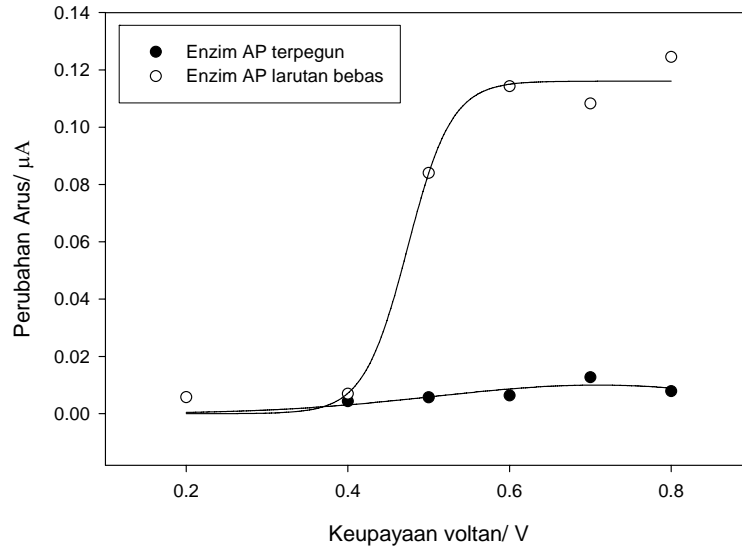
Perencatan enzim AP dijalankan dengan mendedahkan elektrod bercetak skrin terpegun enzim AP kepada larutan 2,4-D (1-200 ppm) selama 15 minit. Perencatan aktiviti enzim oleh pestisid 2,4-D dapat ditentukan dengan membandingkan isyarat arus biopenderia sebelum dan selepas perencatan. Peratusan perencatan dapat dikira seperti berikut:

$$\% \text{ perencatan} = \frac{I_0 - I_A}{I_0} \times 100$$

$I_0$  ialah perubahan arus sebelum perencatan dan  $I_A$  ialah perubahan arus selepas perencatan.

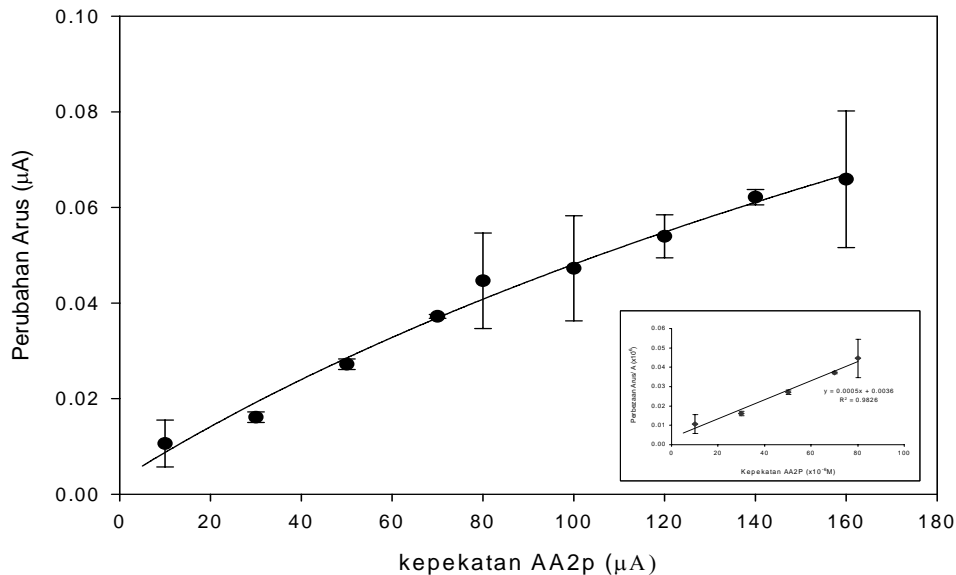
### **Keputusan dan Perbincangan**

Perhubungan di antara keupayaan elektrik dengan tindak balas enzim-substrak ditunjukkan dalam Rajah 2. Arus kelihatan malar pada permulaan, apabila sampai +0.6V arus terus meningkat dan mencapai maksimum bagi tindak balas enzim dalam larutan bebas dan enzim terpegun. Maka keupayaan +0.6V diguna sebagai keupayaan optima untuk pencirian rangsangan biopenderia walaupun Mazzei et al. [12] telah melaporkan keupayaan +0.4V boleh digunakan untuk biopenderianya. Jelas bahawa enzim AP pada keadaan bebas adalah lebih aktif berbanding enzim AP terpegun dalam hibrid sol-gel/kiotsan. Substrak AA2P tidak dapat bertindak secara terus dengan enzim kerana memerlukan masa untuk meresap ke dalam membran polimer [13].



Rajah 2: Voltamogram hidrodinamik untuk tindak balas enzim antara ALP dan AA2P (80  $\mu$ M) dalam keadaan ALP terpegun dan bebas (dalam TrisHCl, 0.1M; pH 8.5, 1 mM MgCl<sub>2</sub>)

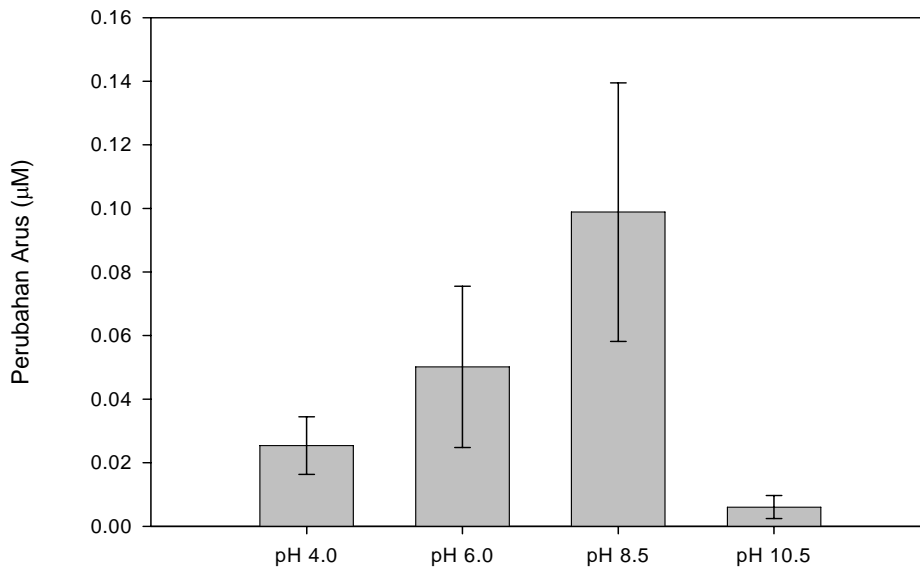
Rajah 3 menunjukkan profil rangsangan biopenderia enzim AP terhadap substrak AA2P pada julat kepekatan 10-160  $\mu$ M. Arus semakin meningkat dengan kepekatan substrak AA2P dan arus menjadi hampir malar pada kepekatan substrak 80  $\mu$ M. Julat rangsangan linear biopenderia enzim AP ialah julat 10-80  $\mu$ M dengan nilai  $R^2 = 0.98$ .



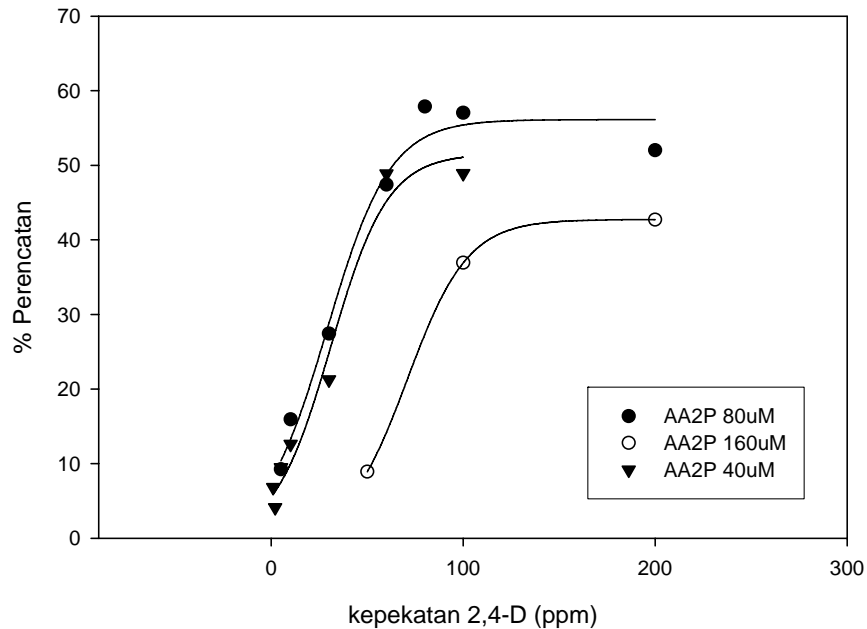
Rajah 3: Profil rangsangan biopenderia SPE terhadap kepekatan substrak AA2P dan julat rangsangan linearnya (dalam TrisHCl, 0.1M; pH 8.5, 0.60 V melawan rujukan Ag/AgCl)

Ujian pH dijalankan terhadap biopenderia enzim AP kerana semua protein, termasuk enzim adalah peka terhadap perubahan parameter pH. Setiap enzim mempunyai pH optimum yang tersendiri dengan aktiviti tindak balas yang paling maksimum pada pH itu. Rajah 4 menunjukkan kesan pH ke atas rangsangan biopenderia. Aktiviti enzim AP didapati tinggi pada medium pH 8.5, enzim AP dilaporkan aktif pada julat pH 8-10 [8,14]. Graf aktiviti enzim adalah berbentuk "loceng" dan ini menerangkan "model diprotik".

Cerakin kinetik yang melibatkan perencatan sistem enzim yang spesifik telah banyak digunakan sebagai kaedah analisis untuk pengesanan pencemaran makanan dan persekitaran. Dalam kajian ini, asai perencatan enzim telah dilakukan dengan mengguna biopenderia yang mampu menentu sampel keracunan pestisid. Biopenderia yang dibangunkan berasaskan perencatan secara kaedah elektrokimia boleh menentukan ketoksikan 2,4-D dengan cepat dan mudah. Perencatan berlaku disebabkan enzim AP merupakan metaloenzim yang mengandungi tapak aktif  $Zn^{2+}$  dan  $Mg^{2+}$  yang bertindak balas dengan sebatian organik (misalnya pestisid) dan logam toksik yang mengakibatkan pengurangan aktiviti enzim [2]. Rajah 5 menunjukkan peratusan perencatan enzim AP selepas 15 minit terdedah kepada larutan pestisid 2,4-D. Perencatan enzim AP oleh pestisid 2,4-D mencapai maksimum dan tetap pada 50% perencatan.



Rajah 4: Kesan perubahan pH ke atas rangsangan biopenderia (dalam TrisHCl, 0.1M; pH 8.5, 0.60 V melawan rujukan Ag/AgCl)



RAJAH 5: Rangsangan biopenderia yang mempamerkan tahap perencatan enzim AP oleh pestisid 2,4-D dalam tiga kepekatan substrak AA2P yang berbeza

### Kesimpulan

Biopenderia 2,4-D terpegun enzim AP telah dibangunkan berasaskan analisis aktiviti perencatan enzim AP. Interaksi enzim dengan pestisid 2,4-D telah menghasilkan satu biopenderia ringkas untuk pemantauan pestisid dengan cepat dan mudah. Di samping itu, biopenderia 2,4-D berasaskan elektrod bercetak skrin adalah mudah disediakan dan boleh diguna secara pakai buang.

### Penghargaan

Penghargaan ditujukan kepada MOSTI yang membiayai projek penyelidikan melalui gran IRPA 09-03-03-0184-EA001 dan Biasiswa Pasca siswazah.

### Rujukan

1. Balague, C.E., Ruiz, C.S., Rey, R., Evangelista de Duffard, A.M, Elena, M. & Nader-Macias. 2002. Effect of herbisid 2,4-D dichlorophenoxyacetic acid on uropathogenic *Escherichia coli* virulence factors. *Toxicology*.177: 143-155
2. Sanchez, F.G., Diaz, A.N., Peinado, M.C.R. & Belledone, C. 2003. Free and sol-gel immobilized alkaline phosphatase-based biosensor for the determination of pesticides and inorganic compounds. *Analytical. Chimica. Acta*. 484: 45-51
3. Kaur, J. Singh, K.V., Schmid, A.H., Varshney, G.C., Suri, C.R. & Raje, M. 2004. Atomic force spectroscopy-based study of antibody pesticide interactions for characterization of immunosensor surface. *Biosensors & Bioelectronics*. 20 : 284-293
4. Nunes, S. G., Jeanty, G. & Marty, Jean-Louis. 2004. Enzyme immobilization procedures on screen-printed electrodes used for the detection of anticholinesterase pesticides comparative study. *Analytica Chimica Acta*. 523: 107-115

5. Mazzei, F., Botre, F., Montilla, S., Pilloton, R., Podesta, E. & Botre, C. 2004. Alkaline phosphatase inhibition based electrochemical sensors for the detection pesticides. *Journal of Electroanalytical Chemistry*. 574:95-100
6. Wang, J. & Chen, L. 1999. Amperometric thick-film strip electrodes for monitoring organophosphate nerve agents based on immobilized organophosphorus hydrolase. *Analytical Chemistry*.71: 2246-2249
7. Satoh, I. & Iijima, Y. 1995. Multi-ion biosensor with use of a hybrid-enzyme membrane. *Sensors & Actuators B*. 24-25: 103-106
8. Diaz, A. N., Sanchez, F. G., Ramos, M.C. & Torrijas, M. C. 2002. Horseradish peroxidase sol-gel immobilized for chemiluminescence measurements of alkaline-phosphatase activity. *Sensors & Actuators B*. 82: 176-179.
9. Guo, Y. & Gudalupe, A. R. 1998. Screen-printable surfactant-induce sol-gel graphite composites for electrochemical sensors. *Sensor & Actuators B*. 46: 213-219.
10. Yang, Y.M., Wang, J.W., Tan, R.X. 2004. Immobilization of glucose oxidase on chitosan-SiO<sub>2</sub> gel. *Enzyme and Microbial Technology*. 34: 126-131.
11. Miao, Y & Tan, S.N. 2001. Amperometric hydrogen peroxide biosensor with silica sol-gel/chitosan film as immobilization matrix. *Analytica Chimica Acta*. 437: 87-93
12. Mazzei, F., Botre, F., Montilla, S., Pilloton, R., Podesta, E. & Botre, C. 2004. Alkaline phosphatase inhibition based electrochemical sensors for the detection pesticides. *Journal of Electroanalytical Chemistry*. 574:95-100.
13. Wang, J., Pamidi, P.V.A. & Park, D.S. 1996. Screen-printable sol-gel enzyme-containing carbon inks. *Analytical Chemistry*. 68: 2705-2708
14. Kokado, A., Arakawa, H. & Maeda, M. 2000. New electrochemical assay of alkaline phosphatase using ascorbic acid 2-phosphate and its application to enzyme immunoassay. *Analytica Chimica Acta*. 407: 119-125A