

## Biosensor DNA Voltametri Berasaskan Nanozarah Emas Bersalut Elektrod Bercetak Skrin Karbon untuk Pengesanan DNA Organisma Terubah Suai Genetik (GMO) (Voltammetric DNA Biosensor based on Gold Nanoparticles-Coated Carbon Screen-Printed Electrode for Genetically Modified Organism (GMO) Detection)

NAHDYA KHAIRANI<sup>1</sup>, HAN YIH LAU<sup>2</sup>, ZAMRI ISHAK<sup>2</sup>, LEE YOOK HENG<sup>3,\*</sup> & LING LING TAN<sup>3</sup>

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

<sup>2</sup>*Malaysian Agriculture Research Institute (MARDI), 43400 Serdang, Selangor Darul Ehsan, Malaysia*

<sup>3</sup>*Pusat Kajian Bencana Asia Tenggara (SEADPRI), Institut Alam Sekitar dan Pembangunan (LESTARI), Universiti Kebangsaan Malaysia, 43600 UKM Bangi, Selangor Darul Ehsan, Malaysia*

*Diserahkan: 15 Mac 2022/Diterima: 23 Mei 2022*

### ABSTRAK

Genosensor voltametri untuk pengesanan DNA organisma terubah suai genetik (GMO) telah dibangunkan berasaskan nanozarah emas (AuNPs) dan elektrod pes karbon bercetak skrin (SPE). AuNPs telah dipegunkan pada SPE melalui kaedah pertumbuhan perantara benih dan dicirikan dengan mikroskop elektron pengimbasan (SEM). 6-Mercapto-1-hexanol (MCH) telah digunakan untuk membentuk lapisan mono prob DNA rantai tunggal (ssDNA) pada SPE terubah suai AuNPs (AuNPs-SPE). Biosensor GMO telah dioptimumkan secara elektrokimia menggunakan oligonukleotida sintetik melalui teknik voltametri denyutan pembezaan (DPV). Biosensor GMO yang dioptimumkan kemudiannya digunakan untuk menganalisis sampel sebenar bagi pengesanan khusus urutan DNA dalam virus mozek kubis bunga, iaitu gen CaMV 35S. Isyarat penghibridan DNA dipantau berdasarkan arus puncak pengoksidaan penunjuk redoks asid monosulfonat antraquinona (AQMS) semasa interkalasinya ke dalam dupleks DNA. Biosensor GMO memberi rangsangan secara linear kepada DNA terubah suai genetik (GM) antara 0.1 nM dan 300.0 nM dan had pengesanan diperoleh pada 0.06 nM. Sisihan piawai relatif (RSD) kebolehlulangan biosensor GMO dianggarkan pada 6.7-7.8%. Biosensor GMO berasaskan AuNPs mempamerkan prestasi pengesanan DNA yang lebih baik daripada segi julat linear dinamik dan had pengesanan berbanding dengan biosensor GMO elektrokimia yang dilaporkan sebelum ini. Biosensor DNA elektrokimia ini menyediakan satu platform pengesanan pakai buang untuk aplikasi dalam ujian bahan GMO.

Kata kunci: Biosensor DNA; elektrod pes karbon bercetak skrin; nanozarah emas; organisma terubah suai genetik; voltametri denyutan pembezaan

### ABSTRACT

A voltammetric genosensor for detection of genetically modified organism (GMO) DNA has been developed based on gold nanoparticles (AuNPs) and screen-printed carbon paste electrode (SPE). The AuNPs was immobilized on the SPE via seed mediated growth method and characterized with scanning electron microscopy (SEM). 6-Mercapto-1-hexanol (MCH) has been used to form a well aligned monolayer of single-stranded DNA (ssDNA) probes on the AuNPs-modified SPE (AuNPs-SPE). The GMO biosensor has been electrochemically optimized using synthetic oligonucleotides via differential pulse voltammetry (DPV) technique. The optimized GMO biosensor was then applied to real samples analysis for specific detection of DNA sequence in cauliflower mosaic virus i.e., CaMV 35S gene. DNA hybridization signal was monitored based on oxidation peak current of anthraquinone monosulfonic acid (AQMS) redox indicator during its intercalation into DNA duplex. The GMO biosensor response linearly to genetically modified (GM) DNA between 0.1 nM and 300.0 nM and the limit of detection was obtained at 0.06 nM. The reproducibility relative standard deviation (RSD) of the GMO biosensor was estimated at 6.7-7.8%. The AuNPs-based GMO biosensor exhibited improved DNA sensing performance with respect to dynamic linear range and detection limit compared to previously reported electrochemical GMO biosensor. The proposed electrochemical DNA biosensor for GMO provides a disposable sensing platform for the application in GMO material testing.

Keywords: Differential pulse voltammetry; DNA biosensor; genetically modified organism; gold nanoparticles; screen-printed carbon paste electrode

## PENGENALAN

Penyelidikan DNA telah membuat penemuan penting dalam bidang biosensor sejak beberapa tahun yang lalu. Biosensor berasaskan asid nukleik mempunyai pelbagai fungsi dan berfungsi sebagai alat pemantauan utama dalam pelbagai bidang seperti sains makanan untuk pengesanan patogen makanan (Wang et al. 2008; Wu et al. 2019), analisis perubatan (Cesewski & Johnson 2020), farmaseutikal (Chiorcea-Paquim & Oliveira-Bett 2021) dan sains alam sekitar (Lucarelli et al. 2002; Raju et al. 2020). Konsep kerja biosensor DNA pada asasnya adalah berdasarkan penghibridan DNA rantai tunggal prob DNA (ssDNA) terpegun pada permukaan transduser dengan rantai DNA pelengkapannya (cDNA). Isyarat penghibridan DNA boleh dikesan menggunakan resonans plasmon permukaan (SPR) berdasarkan indeks biasan relatif DNA sebelum dan selepas tindak balas penghibridan DNA (Mariotti et al. 2002). Perbezaan jisim permukaan transduser juga boleh dieksploitasi untuk memantau tindak balas penghibridan DNA menggunakan teknologiimbangan mikro kristal kuarza (QCM) (Mannelli et al. 2003). Pengesanan penghibridan DNA elektrokimia ialah kaedah yang paling lazim digunakan pada masa kini untuk penentuan kuantitatif DNA sasaran. Isyarat penghibridan DNA biasanya dikawal oleh interkalasi label redoks DNA dengan perbezaan arus diukur sebelum dan selepas penghibridan DNA. Pengesanan DNA elektrokimia adalah kaedah yang paling digemari kerana ia mampu mengesan kepekatan DNA yang sangat rendah, reka bentuk biosensor yang mudah dan pengukuran pantas (Lucarelli et al. 2008).

Kini, banyak penyelidikan dalam bidang kejuruteraan genetik telah berfokus ke arah menghasilkan organisma terubah suai genetik (GMO). Teknologi GMO pertama dalam tumbuhan telah diperkenalkan di pasaran pada tahun 1996 (Shokere et al. 2009). Kelebihan teknologi ini ialah masa penuaian yang lebih singkat, kualiti tanaman yang lebih tinggi dan pemakanan tumbuhan yang lebih baik (Rabiei et al. 2013). Baru-baru ini, terdapat banyak makanan yang mengandungi GMO dan negara Eropah telah menggunakan peraturan tertentu untuk mengawal ramuan GMO dalam makanan untuk melindungi persekitaran semula jadi dan menjaga kesihatan manusia, selain untuk melindungi hak pengguna dan pengeluaran (Nadal et al. 2006). Makanan terproses yang mengandungi GMO hendaklah dinyatakan pada label. Walaupun pelabelan makanan terubah suai genetik (GM) telah dikuatkuasakan, sesetengah pengeluaran enggan mendedahkan ramuan GM (Wujung et al. 2004). Walaupun makanan terproses telah menjalani

rawatan haba semasa pemprosesan, DNA dalam makanan kekal utuh dan lebih stabil daripada sebatian protein (Rabiei et al. 2013). Oleh itu, DNA adalah sasaran yang ideal untuk pengesanan khusus GMO dalam makanan. Kaedah mikrob tradisi berasaskan media kultur pada agar nutrien untuk analisis makanan adalah mahal dan memakan masa. Dari segi selektiviti, biosensor berdasarkan pengesanan jujukan DNA akan menjadi cara pemantauan GMO yang lebih baik kerana ia adalah mudah, berkos rendah dan mengambil masa tindak balas yang singkat.

Kebanyakan biosensor DNA yang dilaporkan sebelum ini telah dibangunkan berdasarkan elektrod emas pukal konvensional. Prarawatan elektrokimia elektrod emas adalah penting untuk membersihkan bahan penjerap setiap kali pengukuran diambil untuk biosensor DNA berasaskan elektrod emas (Akkapinto et al. 2021; Antuña-Jiméne et al. 2020; Wong et al. 2005). Larutan asid menghakis kuat seperti larutan piranha biasanya diperlukan untuk prarawatan kimia elektrod emas sebelum langkah penggilapan mekanikal dan elektrokimia elektrod dijalankan untuk memastikan penyingkiran bendasing secara menyeluruh daripada uji kaji sebelumnya. Ini menjadikan analisis seluruh DNA elektrokimia mengambil masa yang lama. Sebaliknya, dengan menggunakan elektrod bercetak skrin (SPE) yang lebih ekonomi dan boleh difabrikasi melalui teknik penghasilan secara besar-besaran, ia boleh menyingkirkan langkah prarawatan elektrod. Memandangkan ia boleh dibuang selepas setiap kali analisis dijalankan, ia mengelakkan masalah pencemaran dalam analisis seterusnya dan menjadikan keseluruhan proses analisis lebih mudah. Oleh kerana elektrod SPE boleh dihasilkan secara pukal, satu unit elektrod SPE adalah jauh lebih murah daripada elektrod emas planar.

Prob DNA dengan kumpulan berfungsi boleh terpegun secara spontan pada permukaan elektrod emas melalui ikatan kovalen antara kumpulan berfungsi tiol (-SH) dan permukaan emas. Han et al. (2020) menggunakan pendekatan anjakan galvanik untuk memegunkan nanozarah emas (AuNPs) pada elektrod emas satah diikuti dengan penjerapan kimia prob DNA pada elektrod emas terubah suai AuNPs. Penghibridan DNA dipantau menggunakan penunjuk elektroaktif heksaamineruthenium(III) klorida  $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$  melalui kaedah voltametri kitaran (CV) dan voltametri denyutan pembezaan (DPV). SPE bercetak grafit dan dakwat perak juga telah digunakan oleh Meric et al. (2004) untuk pemegungan prob ssDNA secara elektrokimia bagi

mengesan nopal sintetase-terminator, yang merupakan urutan DNA yang biasanya dimasukkan ke dalam GMO dan metilena biru (MB) digunakan sebagai penunjuk penghibridan DNA. Selain daripada AuNPs, Wang et al. (2008) menggunakan nanozarah platinum (PtNPs) untuk membangunkan biosensor DNA untuk pengesanan GMO dengan PtNPs dipegunkan secara elektrokimia pada elektrod karbon berkaca dan prob DNA dipegunkan pada permukaan GCE terubah suai PtNPs melalui teknik salutan titisan. Tindak balas penghibridan DNA ditentukan dengan pengukuran voltametri menggunakan ion  $[\text{Co}(\text{phen})_3]^{3+}$  sebagai penunjuk redoks.

Dalam kajian ini, SPE bersalut AuNP terpegun dengan prob ssDNA digunakan sebagai biosensor untuk pengesanan GMO. AuNPs telah diintegrasikan dalam biosensor DNA melalui kaedah pertumbuhan perantara benih emas. Alkanatiol seperti 6-Mercapto-1-heksanol (MCH) digunakan untuk membentuk lapisan mono himpunan diri (SAM) prob ssDNA pada elektrod AuNPs-SPE. SAM alkanatiol terbentuk apabila permukaan transduser telah tepu dengan molekul alkanatiol (Koswacka 2004). Saiz dan morfologi AuNPs masing-masing dikaji menggunakan mikroskop transmisi elektron (TEM) dan mikroskop elektron pengimbasan pancaran medan (FESEM). Parameter pencirian yang berbeza seperti kesan larutan penimbal, kesan kation dan tempoh penghibridan DNA telah dikaji. Biosensor DNA kemudiannya digunakan untuk pengesanan GMO menggunakan DNA virus mozek bunga kubis GM. Memandangkan AuNPs mempunyai luas permukaan yang besar, kekonduksian yang sangat tinggi dan biokesesarian yang baik, AuNPs boleh bertindak sebagai matriks bio-pegun untuk meningkatkan jumlah prob ssDNA terpegun pada permukaan SPE dan berfungsi sebagai penguat untuk meningkatkan isyarat penghibridan DNA dan menurunkan had pengesanan biosensor GMO.

## BAHAN DAN KAEDAH

### BAHAN KIMIA

Aurum(III) klorida trihidrat ( $\text{HAuCl}_4$ ), trinitrium sitrat dihidrat  $[\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \cdot 2(\text{H}_2\text{O})]$ , natrium borohidrida ( $\text{NaBH}_4$ ), 6-mercapto-1-heksanol (MCH), natrium dihidrogen fosfat ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ), disodium hidrogen fosfat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ), magnesium klorida ( $\text{MgCl}_2$ ) dan mangan(II) klorida tetrahidrat ( $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ) diperoleh daripada Sigma. Setiltrimetilammonium bromida (CTAB), natrium hidroksida ( $\text{NaOH}$ ), kalium hidroksida ( $\text{KOH}$ ), asid askorbik, di-kalium hidrogen fosfat

( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ), kalium dihidrogen fosfat ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ), kalium klorida ( $\text{KCl}$ ), natrium klorida ( $\text{NaCl}$ ) dan etanol ( $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ ) diperoleh daripada System. Tris(hidoksimetil)aminometana (Tris-HCl), asid etilenadiaminetetraasetik (EDTA) dan asid monosulfonat antrakuinona (AQMS) masing-masing dibekalkan oleh Duchefa biochemie, Univar dan Acros organics. Semua reagen adalah bergred analitik dan digunakan seperti yang diterima tanpa penulenan selanjutnya. Dua jenis DNA telah digunakan dalam kajian ini. DNA 1 ialah DNA sintetik yang diperoleh daripada Sigma dan digunakan dalam semua kajian pencirian biosensor DNA. DNA 2 ialah DNA yang diekstrak daripada promoter virus mozek kubis bunga (CaMV 35S). Gen CaMV 35S ini biasanya terdapat dalam DNA GMO. Urutan DNA yang digunakan dalam kajian ini disenaraikan seperti berikut:

DNA 1 : ssDNA :  
 5'GGGGCAGTGCCTCACAACCT[ThiC3]3'  
 cDNA : 5'AGGTTGTGAGGCACTGCCCC3'  
 non-cDNA :  
 5'GGATGGACGAAGCGCTCAGG3'  
 DNA 2 : ssDNA :  
 5'TATCCGGAAACCTCCTCGGA[ThiC3]3'  
 cDNA : 5'TCCGAGGAGGTTTCCGGATA3'  
 non-cDNA : 5'GTAGCATGAACTGTCATCGA3'

### INSTRUMENTASI

Pengukuran elektrokimia telah dijalankan dengan menggunakan sistem analisis elektrokimia Autolab PGSTAT 12 dan pakej perisian GPES 4.9 (Eco Chemie, Belanda). Sistem tiga elektrod terdiri daripada elektrod kerja SPE, elektrod rujukan Ag/AgCl dan elektrod penunjuk karbon berkaca. Saiz dan morfologi permukaan AuNPs telah dikaji dengan menggunakan teknik mikroskop transmisi elektron (TEM CM 12, Philips) dan mikroskop elektron pengimbasan pancaran medan (FE-SEM Supra 55 VP, Zeiss).

### PENYEDIAAN ELEKTROD AuNPs-SPE

AuNPs dipegunkan pada SPE dengan menggunakan dua larutan emas yang berbeza seperti yang diformulasi oleh Busbee et al. (2003) dan (Zhang et al. 2004) dengan sedikit pengubahsuaian. SPE pada mulanya direndam ke dalam larutan benih emas yang mengandungi 9 mL air ternyahion, 0.25 mL 0.01 M  $\text{HAuCl}_4$ , 0.25 mL 0.01 M  $\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \cdot 2(\text{H}_2\text{O})$  dan 0.25 mL 0.1 M  $\text{NaBH}_4$  selama 30 minit. Kemudian, SPE tersebut dibilas dengan air

ternyahion dan dikeringkan dengan gas nitrogen diikuti dengan mencelup dalam larutan pertumbuhan emas selama 24 jam. Larutan pertumbuhan emas disediakan dengan mencampurkan 18 mL 0.1 CTAB, 0.5 mL 0.01 M HAuCl<sub>4</sub>, 0.01 mL asid askorbik 0.1 M dan 0.01 mL 0.1 M NaOH.

#### PENYEDIAAN BIOSENSOR DNA

Elektrod SPE terubah suai AuNPs (AuNPs-SPE) direndam dalam 3  $\mu$ M larutan prob ssDNA selama 90 min. Pencairan lanjut prob ssDNA dilakukan dengan menggunakan larutan penimbal kalium fosfat 0.03 M pada pH 7.5. Kemudian, elektrod AuNPs-SPE terubah suai ssDNA (ssDNA-AuNPs-SPE) dibilas dengan penimbal kalium fosfat 0.03 M (pH 7.5) dan dirawat dengan 0.02 M MCH selama 30 min untuk menjajarkan lapisan prob ssDNA terpegun pada permukaan AuNPs-SPE. Pencairan MCH dilakukan dengan menggunakan etanol 65%. Elektrod ssDNA-AuNPs-SPE kemudiannya dibilas berulang kali dengan larutan penimbal kalium fosfat 0.03 M (pH 7.5) dan direndam dalam larutan penghibridan DNA yang mengandungi 0.03 M cDNA pada pH 7.5 selama 60 min pada suhu bilik (25 °C). Interkalasi penunjuk elektroaktif AQMS dalam dupleks DNA dilakukan dengan menambahkan 1  $\mu$ M AQMS dalam larutan penimbal kalium fosfat 0.03 M pH 7.5 dan dibiarkan selama 4 jam.

#### PENGUKURAN ELEKTROKIMIA

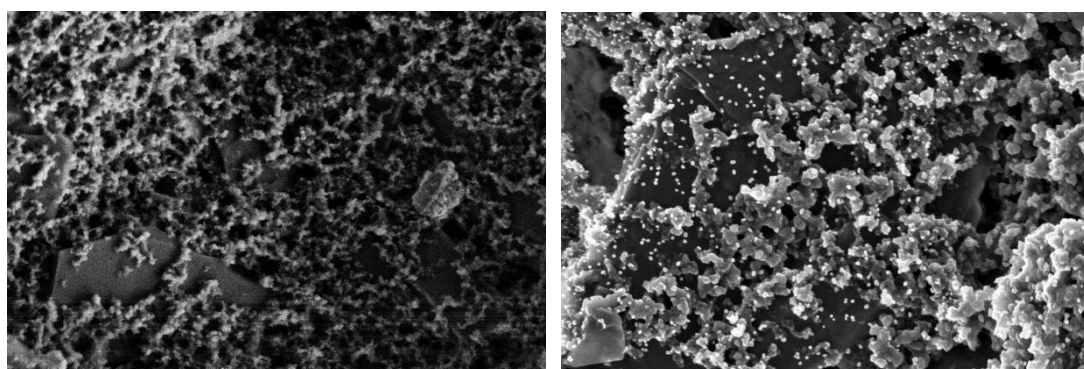
Elektrod AuNPs-SPE terpegun dengan prob ssDNA telah dicirikan dengan menggunakan potensiostat untuk pengukuran elektrokimia penghibridan DNA dengan DNA sasarannya. Arus puncak pengoksidaan AQMS elektroaktif telah ditentukan di sekitar keupayaan -0.55 V. Kesan larutan penimbal yang berbeza terhadap tindak balas biosensor DNA telah dijalankan dengan menggunakan penimbal tris-HCl, kalium fosfat dan

natrium fosfat pada pH 7.5 dan 0.03 M. Pencirian kesan kation terhadap tindak balas penghibridan DNA dijalankan dengan menambah ion mangan(II) (Mn<sup>2+</sup>), magnesium(II) (Mg<sup>2+</sup>), natrium (Na<sup>+</sup>) dan kalium (K<sup>+</sup>) secara berasingan ke dalam penimbal kalium fosfat 0.03 M pada pH 7.5. Tempoh penghibridan DNA ditentukan dengan mengukur rangsangan DPV biosensor DNA pada masa rangsangan 15 min, 30 min, 60 min, 90 min, 120 min dan 150 min dalam larutan penimbal kalium fosfat 0.03 M (pH 7.5) yang mengandungi 1 nM cDNA dan 1  $\mu$ M AQMS. Selepas itu, biosensor DNA elektrokimia yang dibangunkan berasaskan elektrod SPE terubah suai AuNPs digunakan untuk pengesanan DNA GMO (DNA 2).

#### HASIL DAN PERBINCANGAN

##### PENCIRIAN NANOZARAH EMAS

Kaedah sintesis perantara benih AuNPs memerlukan dua media nukleasi untuk pertumbuhan lengkap AuNPs. Larutan benih emas yang disediakan daripada agen penurun kuat NaBH<sub>4</sub> adalah untuk mengurangkan saiz AuNPs, manakala larutan pertumbuhan emas disediakan menggunakan agen penurun lemah. Surfaktan CTAB digunakan untuk membentuk sfera AuNPs yang sempurna dan untuk menumbuhkan AuNPs kepada saiz yang lebih besar (Busbee et al. 2003; Pellas et al. 2020). Seperti yang diperhatikan di bawah TEM, saiz purata AuNPs yang dihasilkan dalam larutan pertumbuhan emas adalah sekitar 27 nm. Morfologi permukaan elektrod AuNPs-SPE adalah diperoleh dengan menggunakan FESEM. Rajah 1(a) dan 1(b) menunjukkan imej FESEM bagi SPE kosong dan elektrod AuNPs-SPE. Kehadiran AuNP terpegun pada SPE boleh dilihat sebagai titik terang dalam imej FESEM (Rajah 1(b)) dan puncak pengoksidaan AuNPs voltametri boleh diperhatikan pada 0.1 V dengan sisihan piawai relatif (RSD) yang baik sebanyak 2.6%.



a)

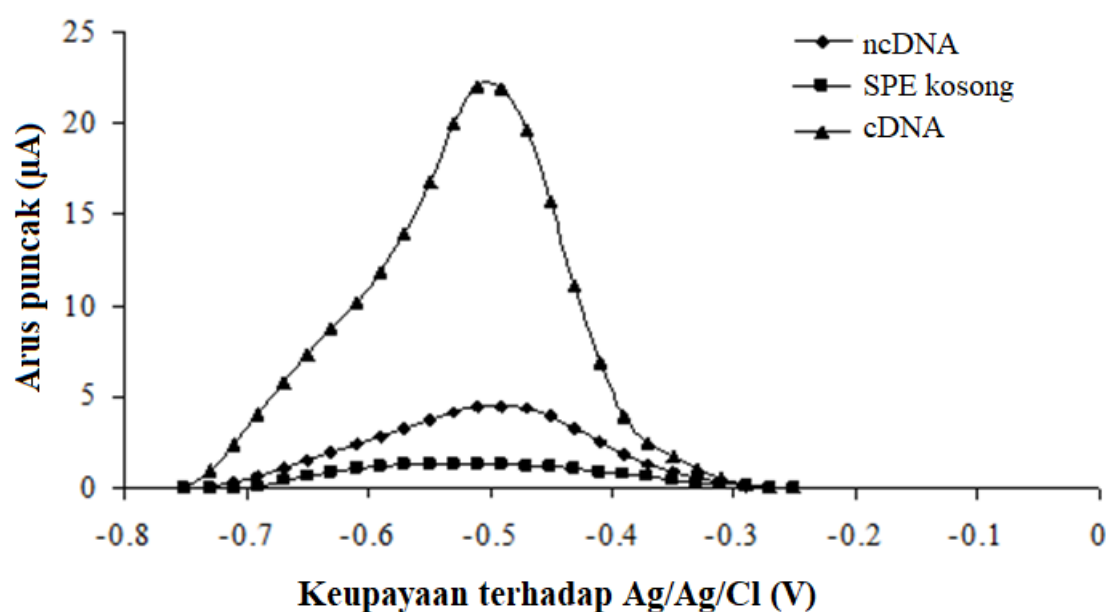
b)

RAJAH 1. Imej FESEM a) SPE kosong dan b) AuNPs-SPE disediakan dengan kaedah pertumbuhan perantara benih di bawah pembesaran 50k  $\times$

PEMBANGUNAN DAN PENGOPTIMUMAN BIOSENSOR  
DNA ELEKTROKIMIA

Reka bentuk biosensor melibatkan integrasi SPE, AuNPs, prob ssDNA dan MCH (MCH/ssDNA-AuNPs-SPE). Sebatian organik MCH telah digunakan untuk menyingkirkan penjerapan tidak khusus prob ssDNA pada permukaan elektrod AuNPs-SPE (Herne & Tarlov 1997), supaya prob ssDNA boleh berdiri tegak pada permukaan elektrod untuk membolehkan akses terus kepada rantaian cDNA dan penghibridan DNA boleh berlaku dengan pantas (Karaboduk et al. 2021). Molekul MCH mengikat secara kovalen pada permukaan elektrod AuNPs-SPE melalui ikatan emas-tiol (Au-S). Puncak voltametri penurunan AQMS dapat diperolehi menunjukkan tiada kesan gangguan atau halangan daripada AuNPs semasa tindak balas penghibridan DNA berlaku pada permukaan elektrod. Kumpulan hidroksil (-OH) bercas negatif pada molekul MCH terpegun menolak kumpulan fosfat dalam prob ssDNA yang juga

bercas negatif, dengan itu menghalang interaksi tidak khusus dengan ssDNA terpegun pada elektrod terubah suai AuNPs (Dharuman & Hahn 2007). Biosensor DNA yang dibangunkan telah digunakan untuk mengesan DNA sasaran dengan kaedah DPV dan AQMS digunakan sebagai label penghibridan DNA. Rangsangan puncak DPV AQMS pada -0.55 V adalah lebih tinggi untuk cDNA berbanding dengan tiada cDNA (SPE kosong) atau apabila DNA bukan pelengkap (ncDNA) diperkenalkan (Rajah 2). Ini menunjukkan bahawa proses penghibridan DNA telah berlaku antara prob ssDNA terpegun dan cDNA diikuti dengan interkalasi AQMS dalam dupleks DNA. Peningkatan arus puncak adalah disebabkan oleh pengoksidaan AQMS. Isyarat puncak bagi ncDNA adalah lebih tinggi sedikit daripada isyarat SPE kosong kerana jujukan bes ncDNA mengandungi empat bes pelengkap yang boleh berpenghibridan dengan prob DNA terpegun, dan membenarkan interaksi dengan sejumlah kecil interkalator redoks AQMS.

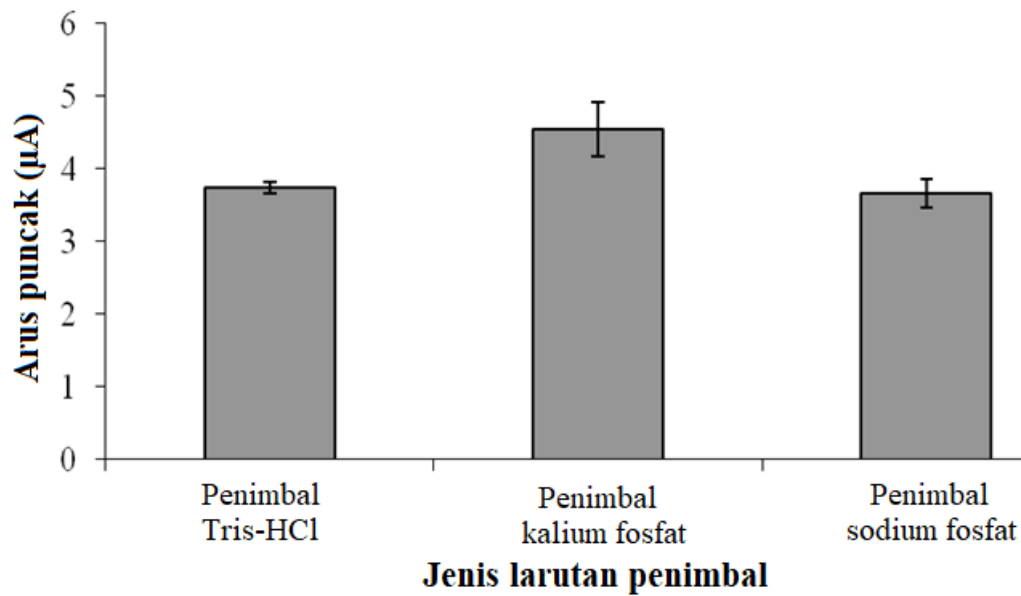


RAJAH 2. Puncak pengoksidaan 1 mM AQMS dalam larutan penimbal kalium fosfat 0.02 M pada pH 7 untuk elektrod kosong dan biosensor DNA yang dihibridkan dengan cDNA dan DNA bukan pelengkap (ncDNA)

Jenis larutan penimbal yang digunakan untuk tindak balas penghibridan DNA telah dicirikan dengan menggunakan penimbal tris-HCl, kalium fosfat dan natrium fosfat dan keputusan DPV menunjukkan bahawa penimbal kalium fosfat 0.03 M pada pH 7.5 adalah penimbal penghibridan DNA yang paling sesuai dengan

rangsangan puncak DPV yang paling tinggi diperolehi menggunakan larutan penimbal ini (Rajah 3).

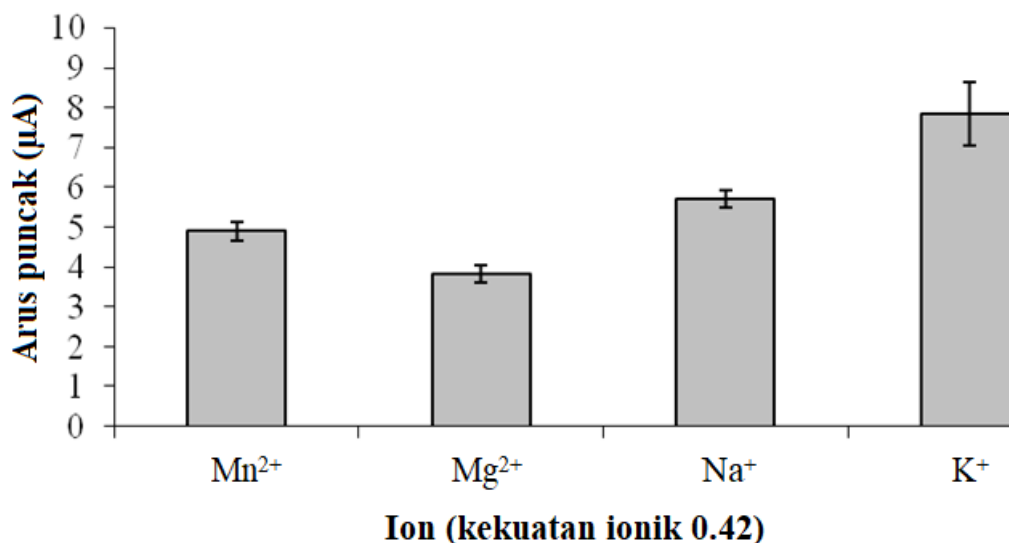
Pengenalan kation ke dalam penimbal penghibridan DNA iaitu penimbal kalium fosfat 0.03 M (pH 7.5) telah dikaji dengan menggunakan ion  $Mn^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Na^+$  dan  $K^+$ . Penambahan kation ke dalam sistem biosensor DNA



RAJAH 3. Kesan jenis larutan penimbal terhadap tindak balas biosensor DNA elektrokimia

dianggap dapat meningkatkan rangsangan tindak balas penghibridan DNA, kerana kation bercas positif ini boleh mengikat dengan prob ssDNA yang bercas bertentangan untuk meningkatkan afinitinya untuk mengikat dengan cDNA, dengan itu meningkatkan isyarat penghibridan DNA. Rajah 4 menunjukkan bahawa isyarat puncak DPV tertinggi telah dicapai dengan kehadiran ion  $K^+$  dengan kekuatan ionik penimbal kalium fosfat dikekalkan pada 0.42. Ion  $K^+$  memberikan rangsangan penghibridan DNA elektrokimia yang paling ketara kerana saiz ion  $K^+$  yang

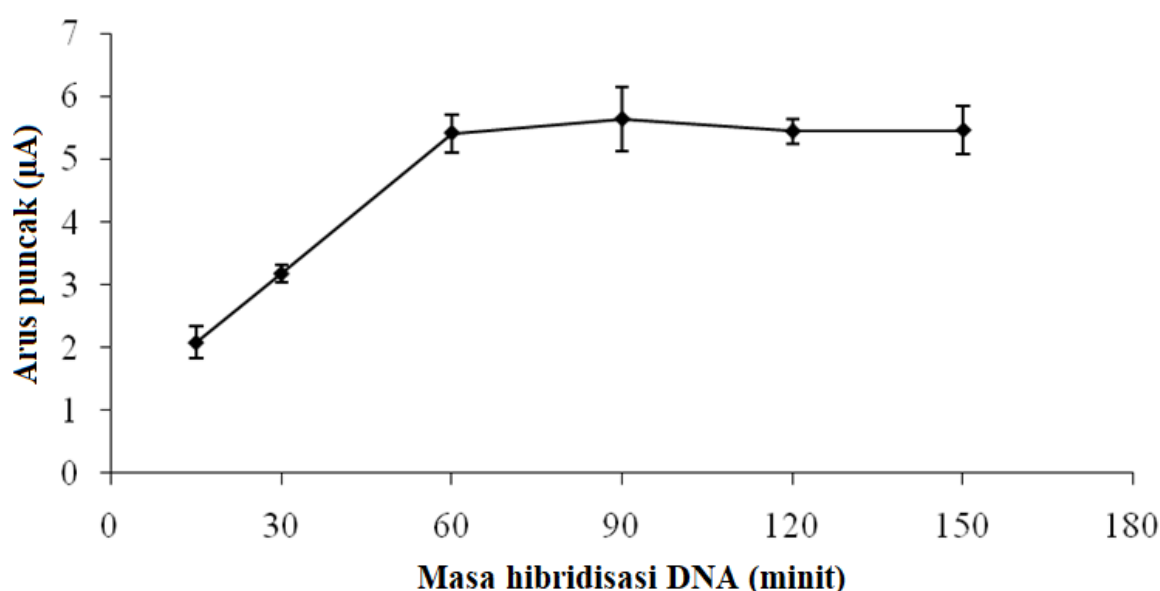
kecil berbanding dengan kation yang lain (iaitu ion  $Mn^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$  dan  $Na^+$ ) membolehkan ia meresap dengan mudah ke dalam prob ssDNA untuk mengikat dengan ion fosfat yang bercas negatif. Oleh itu, kehadiran ion  $K^+$  dalam larutan penghibridan DNA memudahkan prob ssDNA terpegun untuk menghibrid dengan DNA sasaran. Kation lain seperti ion  $Mn^{2+}$  dan  $Mg^{2+}$  didapati sukar untuk melarut dalam larutan penimbal kalium fosfat dan pemendakan yang terbentuk boleh merosakkan struktur cDNA.



RAJAH 4. Tindak balas DPV elektrod DNA dalam penimbal penghibridan DNA ditambah dengan kation yang berbeza

Biosensor DNA yang dibangunkan dalam kajian ini didapati mengambil masa selama 60 min untuk melengkapkan tindak balas penghibridan DNA dengan 1 nM cDNA dalam larutan penimbal kalium fosfat 0.03 M pada pH 7.5 (Rajah 5). Tempoh penghibridan DNA bagi biosensor DNA berasaskan AuNPs dalam kajian ini bukanlah yang paling panjang berbanding dengan biosensor DNA yang dilaporkan sebelum ini berasaskan konsep elektrokimia dan prob DNA terpegun. Beberapa contoh kepustakaan dengan tempoh penghibridan lebih panjang ialah Wong et al. (2005) yang mengambil kira-kira 150 min dan Alizar et al. (2014) melakukan kajian biosensor penentuan DNA

kacang soya GM yang mengambil masa 120 min. Masa penghibridan DNA adalah bergantung kepada muatan prob ssDNA pada permukaan elektrod. Oleh itu, peningkatan muatan prob ssDNA pada permukaan elektrod AuNPs-SPE boleh mempercepatkan kadar tindak balas penghibridan DNA dan meningkatkan rangsangan elektrokimia biosensor. Pengubahsuaian biosensor DNA dengan AuNPs yang bioserasi untuk pengesanan cDNA secara elektrokimia telah mempercepatkan tempoh penghibridan DNA kerana AuNPs adalah sangat reaktif, dengan itu ia mempercepatkan kinetik pemindahan elektron pada permukaan elektrod.



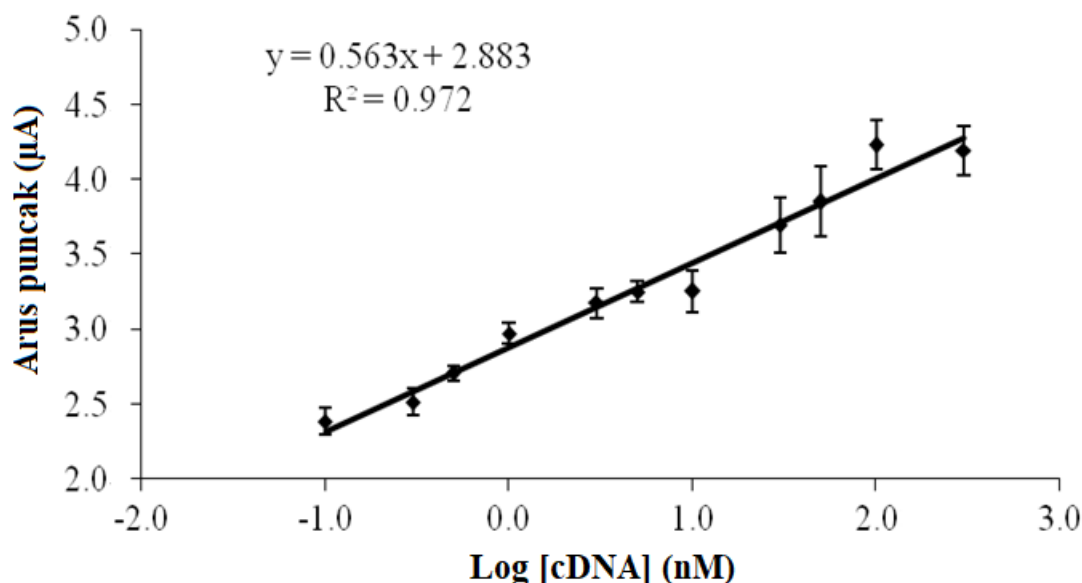
RAJAH 5. Masa penghibridan DNA biosensor DNA berasaskan AuNPs dalam larutan penimbal kalium fosfat 0.03 M pada pH 7.5 yang mengandungi 1 nM cDNA dan 0.3 M KCl

Biosensor DNA elektrokimia berasaskan AuNPs yang dicadangkan telah digunakan dalam pengesanan GMO dengan menggunakan DNA 2. Keluk kalibrasi linear telah diperolehi untuk biosensor DNA antara 0.1 nM dan 300.0 nM GMO (Rajah 6) dengan had pengesanan (LOD) diperolehi pada 0.06 nM. LOD tersebut ditentukan berdasarkan purata rangsangan biosensor DNA blank (tanpa prob ssDNA) ditambah dengan tiga kali sisihan piawainya. Kebolehlulangan biosensor DNA voltametri ialah 7.8% RSD untuk pengesanan 0.1 nM cDNA dan 6.7% RSD untuk pengesanan 1 nM cDNA. Biosensor DNA voltametri yang dibangunkan berasaskan AuNPs

bersalut elektrod SPE berpotensi digunakan dalam pengesanan genetik terubah suai dalam sampel GMO. Kesesuaian biosensor DNA untuk penentuan bahan GMO adalah bergantung kepada jenis jujukan DNA yang digunakan dalam pembinaan biosensor tersebut. Jujukan DNA GMO yang digunakan dalam kajian ini pernah digunakan untuk biosensor DNA yang dilaporkan oleh beberapa kepustakaan sebelum ini dan didapati sesuai untuk penentuan sampel GMO sebenar. Contohnya dalam kajian Alizar et al (2014), biosensor DNA yang menggunakan jujukan DNA GMO yang sama tetapi reka bentuk biosensor yang berbeza telah disahkan sesuai

untuk penentuan DNA GMO dalam sampel sebenar. Oleh itu, biosensor DNA voltametri yang dibangunkan berasaskan AuNPs bersalut elektrod SPE dalam kajian juga dijangka dapat digunakan dalam pengesanan DNA GMO dalam sampel sebenar. Contohnya ujian sampel

GMO sebenar boleh dilakukan dengan sampel beras GM dalam kajian penentusahan DNA biosensor elektrokimia. DNA terlebih dahulu diekstrak daripada tisu beras GM dan penentuan GM DNA boleh dilakukan secara langsung dengan biosensor DNA elektrokimia yang dibangunkan.



RAJAH 6. Julat linear dinamik biosensor GMO dalam larutan penimbal kalium fosfat 0.03 M pada pH 7.5 dan 0.3 M KCl

Sehingga kini, tidak ramai yang melaporkan pengesanan GMO melalui kaedah biosensor DNA elektrokimia. GMO biasanya ditentukan oleh biosensor DNA yang dibangunkan menggunakan kaedah resonans plasmon permukaan (SPR),imbangan mikro kristal

kuarza (QCM) atau beberapa kaedah konvensional lain, seperti ujian tindak balas rantai polimerase (PCR) dan elektroforesis gel. Jadual 1 menunjukkan perbandingan prestasi pengesanan GMO antara biosensor voltametri yang dicadangkan dan biosensor GMO elektrokimia lain yang dilaporkan sebelum ini.

JADUAL 1. Perbandingan prestasi analisis antara biosensor GMO voltametri yang dicadangkan dan biosensor GMO elektrokimia lain yang dilaporkan sebelum ini

Parameter	Kajian ini	Wang et al. (2008)	Duwensee et al. (2009)	Carpini et al. (2004)
Matrik pemegunan	AuNPs-SPE	PtNPs-GCE	Au electrode 50-100 (40 °C)	Au-SPE
Julat linear (nM)	0.1-300 (25 °C)	2.14-214 (50 °C)	& 25-200 (50 °C)	0-25
Masa penghibridan DNA (minit)	60	30	15	20
LOD (nM)	0.06	1.0	10	0.25
Kebolehulangan (%)	6.7	5.9	-	-



Pengesanan kacang soya yang diubah suai secara genetik telah dijalankan dengan menggunakan GCE terubah suai dengan nanozarah platinum (PtNPs) dan  $[\text{Co}(\text{phen})_3]^{3+}$  sebagai penunjuk penghibridan DNA oleh Wang et al. (2008). Duwensee et al. (2009) pula menggunakan prob redoks kompleks osmium tetraoksida bipiridina ( $[\text{OsO}_4(\text{bipy})]$ ) untuk mengesan jagung terubah suai genetik berasaskan elektrod emas planar. Walau bagaimanapun, isyarat penghibridan DNA yang ketara hanya boleh dicapai pada suhu yang tinggi antara 40 °C dan 50 °C untuk kedua-dua kes. Penggunaan dakwat emas bercetak SPE oleh Carpini et al. (2004) tidak menunjukkan prestasi biopengesanan yang ketara kerana permukaan emas yang agak tidak aktif digunakan untuk pengesanan DNA elektrokimia. Penggunaan AuNPs sebagai matriks pemegangan DNA dalam kajian ini telah meluaskan julat linear pengesanan kepekatan DNA dan menurunkan had pengesanan. Pemerhatian yang sama juga dilihat oleh Zhang et al. (2008) dalam kajian penghibridan DNA berasaskan elektrod terubah suai filem zirkonia/nano emas. Saiz AuNPs yang kecil telah membenarkan lebih banyak prob ssDNA dimuatkan pada permukaannya untuk meningkatkan kepekaan biosensor DNA terhadap penentuan cDNA pada kepekatan yang rendah. Pemuatan prob ssDNA yang tinggi pada transduser elektrod juga boleh menggalakkan kadar tindak balas penghibridan DNA yang lebih tinggi pada permukaan AuNPs.

#### KESIMPULAN

Suatu biosensor GMO elektrokimia telah berjaya dibangunkan dengan menggunakan SPE terubah suai AuNPs. Reka bentuk biosensor GMO berasaskan DNA yang dicadangkan adalah lebih mudah berbanding biosensor GMO elektrokimia yang dilaporkan sebelum ini. Prob ssDNA telah dipegunkan pada permukaan AuNPs-SPE melalui kaedah SAM dengan MCH sebagai pelarut. Biosensor DNA juga telah menguji GMO melalui penghibridan DNA dengan julat pengesanan DNA yang lebih luas dan sensitiviti yang lebih tinggi. Oleh kerana biosensor GMO yang dicadangkan adalah kit pengesanan berasaskan SPE, ia boleh dibuang selepas selesai setiap ujian GMO untuk mengelakkan isu pencemaran apabila kuantiti sampel analisis yang banyak terlibat.

#### PENGHARGAAN

Penghargaan dan terima kasih yang tidak terhingga kepada Direktorat Bioteknologi Kebangsaan (MOSTI)

yang telah membiayai geran penyelidikan dengan kod projek penyelidikan UKM-MGI-NBD0021-2007 dan Universiti Kebangsaan Malaysia melalui Geran Universiti Penyelidikan (GUP-2021-066).

#### RUJUKAN

- Akkapinto, C., Subannajui, K., Poo-arporn, Y. & Poo-arporn, R.P. 2021. Disposable electrochemical sensor for food colorants detection by reduced graphene oxide and methionine film modified screen printed carbon electrode. *Molecules* 26(8): 2312.
- Alizar, U., Lee, Y.H., Musa, A., Lau, H., Zamri, I. & Tan, L.L. 2014. A regenerable screen-printed DNA biosensor based on acrylic microsphere-gold nanoparticle composite for genetically modified soybean determination. *Sensors and Actuators B* 190: 694-701.
- Antuña-Jiménez, D., González-García, M.B., Hernández-Santos, D. & Fanjul-Bolado, P. 2020. Screen-printed electrodes modified with metal nanoparticles for small molecule sensing. *Biosensors* 10(9): 1-22.
- Busbee, B.D., Obare, S.O. & Murphy, C.J. 2003. An improved synthesis of high-aspect-ratio gold nanorods. *Advanced Materials* 15: 414-416.
- Carpini, G., Lucarelli, F., Marrazza, G. & Mascini, M. 2004. Oligonucleotide-modified screen-printed gold electrodes for enzyme-amplified sensing of nucleic acids. *Biosensors and Bioelectronics* 20: 167-175.
- Cesewski, E. & Johnson, B.N. 2020. Electrochemical biosensors for pathogen detection. *Biosensors and Bioelectronics* 159: 112214.
- Chiorcea-Paquim, A.M. & Oliveira-Bett, A.M. 2021. DNA electrochemical biosensors for *in situ* probing of pharmaceutical drug oxidative DNA damage. *Sensors* 21(4): 1125.
- Dharuman, V. & Hahn, J.H. 2007. Effect of short chain alkane diluents on the label free electrochemical DNA hybridization discrimination at the HS-ssDNA/diluent binary mixed monolayer in presence of cationic intercalators. *Sensors and Actuators B: Chemical* 127: 536-544.
- Duwensee, H., Mix, M., Broer, I. & Flechsig, G.U. 2009. Electrochemical detection of modified maize gene sequences by multiplexed labeling with osmium tetroxide bipyridine. *Electrochemistry Communications* 11: 1487-1491.
- Han, S., Liu, W., Zheng, M. & Wang, R. 2020. Label-free and ultrasensitive electrochemical DNA biosensor based on urchinlike carbon nanotube-gold nanoparticle nanoclusters. *Analytical Chemistry* 92(7): 4780-4787.
- Herne, T.M. & Tarlov, M.J. 1997. Characterization of DNA probes immobilized on gold surfaces. *Journal of the American Chemical Society* 119: 8916-8920.
- Karaboduk, K. 2021. Modification of screen-printed gold electrode with 1,4-dithiothreitol: Application to sensitive voltammetric determination of Sudan II. *Food Quality and Safety* 5: 1-9.

- Koswakka, S.O. 2004. Self-assembly monolayer resist for electron beam lithography. Thesis MSc. Purdue University (Unpublished).
- Lucarelli, F., Tombelli, S., Minunni, M., Marrazza, G. & Mascini, M. 2008. Electrochemical and piezoelectric DNA biosensors for hybridisation detection. *Analytica Chimica Acta* 609: 139-159.
- Lucarelli, F., Palchetti, I., Marrazza, G. & Mascini, M. 2002. Electrochemical DNA biosensor as a screening tool for the detection of toxicants in water and wastewater samples. *Talanta* 56: 949-957.
- Mariotti, E., Minunni, M. & Mascini, M. 2002. Surface plasmon resonance biosensor for genetically modified organisms detection. *Analytica Chimica Acta* 453: 165-172.
- Mannelli, I., Minunni, M., Tombelli, S. & Mascini, M. 2003. Quartz crystal microbalance (QCM) affinity biosensor for genetically modified organisms (GMOs) detection. *Biosensors and Bioelectronics* 18: 129-140.
- Meric, B., Kerman, K., Marrazza, G., Palchetti, I., Mascini, M. & Ozsoz, M. 2004. Disposable genosensor, a new tool for the detection of NOS-terminator, a genetic element present in GMOs. *Food Control* 15(8): 621-626.
- Nadal, A., Coll, A., La Paz, J.L., Esteve, T. & Pla, M. 2006. A new PCR-CGE (size and color) method for simultaneous detection of genetically modified maize events. *Electrophoresis* 27: 3879-3888.
- Pellas, V., Hu, D., Mazouzi, Y., Mimoun, Y., Blanchard, J., Guibeit, C., Salmain, M. & Boujday, S. 2020. Gold nanorods for LSPR biosensing: Synthesis, coating by silica, and bioanalytical applications. *Biosensors* 10(10): 146.
- Rabiei, M., Mehdizadeh, M., Rastegar, H., Vahidi, H. & Alebouyah, M. 2013. Detection of genetically modified maize in processed foods sold commercially in Iran by qualitative PCR. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research* 12(1): 25-30.
- Raju, V.M., Bhavana, V., Gayathiri, G.K., Suryan, S., Reddy, R., Reddy, N., Ravijumar, C.R. & Santosh, M.S. 2020. A novel disposable electrochemical DNA biosensor for the rapid detection of *Bacillus thuringiensis*. *Microchemical Journal* 159: 297-307.
- Shokere, L.A., Holden, M.J. & Ronald, J.G. 2009. Comparison of fluorometric and spectrophotometric DNA quantification for real-time quantitative PCR of degraded DNA. *Food Control* 20: 391-401.
- Wang, M.Q., Du, X.Y., Liu, Y., Sun, Q. & Jiang, X.C. 2008. DNA biosensor prepared by electrodeposited Pt-nanoparticles for the detection of specific deoxyribonucleic acid sequence in genetically modified soybean. *Chinese Journal of Analytical Chemistry* 36: 890-894.
- Wong, E.L.S., Mearns, F.J. & Gooding, J.J. 2005. Further development of an electrochemical DNA hybridization biosensor based on long-range electron transfer. *Sensors and Actuators B: Chemical* 111: 515-521.
- Wu, Q., Zhang, Y., Yang, Q., Yuan, N. & Zhang, W. 2019. Review of electrochemical DNA biosensors for detecting food borne pathogens. *Sensors* 19(22): 4916.
- Wujung, J., Shirong, J. & Yufa, P. 2004. Comparison of labeling policy of genetically modified products in different countries and territories. *Journal of Agricultural Biotechnology* 12: 1-7.
- Zhang, J., Kambayashi, M. & Oyama, M. 2004. A novel electrode surface fabricated by directly attaching gold nanospheres and nanorods onto indium tin oxide substrate with a seed mediated growth process. *Electrochemistry Communications* 6: 683-688.
- Zhang, W., Yang, T., Jiang, C. & Jiao, K. 2008. DNA hybridization and phosphinothricin acetyltransferase gene sequence detection based on zirconia/nanogold film modified electrode. *Applied Surface Science* 254: 4750-4756.

\*Pengarang untuk surat-menyurat; email: leeyookheng@yahoo.co.uk