

Biosensor Elektrokimia untuk Pengesanan 17β -Estradiol menggunakan Mikrosfera Polimer Metakrilat-Akrlat Terfungsi

(Electrochemical Biosensor for 17β -estradiol Detection using Functional Methacrylate-Acrylate Polymer Microspheres)

ALIFF AIMAN MOHAMAD ROZLAN, SHARINA ABU HANIFAH*, NURFAIZAH ABU TAHRIM & ANWARUL HIDAYAH ZULKIFLI

Jabatan Sains Kimia, Fakulti Sains dan Teknologi, Universiti Kebangsaan Malaysia, 43600 UKM Bangi, Selangor, Malaysia

Diserahkan: 30 April 2024/Diterima: 26 Ogos 2024

ABSTRAK

17β -estradiol (E2) adalah sejenis bahan kimia pengganggu endokrin (EDC) yang sering dikaji kerana sebatian ini banyak dikumuhkan oleh manusia melalui proses perkumuhan dan dilepaskan kembali ke dalam sistem air tanpa dipantau oleh loji rawatan air. Tahap E2 yang tidak normal boleh menyebabkan masalah kesihatan seperti tulang lemah (osteoporosis) dan masalah kesuburan disebabkan oleh ketidakseimbangan hormon. Untuk memastikan pengesanan awal dan pengurusan yang betul bagi keadaan ini, biopengesanan berterusan terhadap tahap E2 adalah penting untuk mengekalkan keseimbangan hormon dan kesihatan keseluruhan. Pendekatan alternatif telah diambil dengan menggabungkan sensor elektrokimia dengan 76-mer aptamer yang mempunyai rantaian khusus E2 yang telah terbukti mempunyai keafinan tinggi kepada E2. Polimer metakrilat-akrlat dengan struktur mikrosfera telah digunakan untuk meningkatkan kepekatan aptamer yang dipegun dan meningkatkan kepekaan sensor tanpa memerlukan amplifikasi oleh bahan konduktif. Penyelidikan ini telah membangunkan biosensor elektrokimia untuk mengesan 17β -estradiol (E2) menggunakan polimer metakrilat-akrlat yang diubah suai. Polimer poli(glisidil metakrilat-*ko*-*n*-butil akrilat) berfungsi dengan nisbah isi padu 90:10 dalam bentuk mikrosfera bertindak sebagai matriks untuk pemegunan E2-aptamer secara kovalen. Berdasarkan analisis elektrokimia, biosensor 17β -estradiol (E2) yang dibangunkan berasaskan aptamer ini telah berjaya menunjukkan julat kepekaan linear antara 0.1 nM - 1.0 μ M ($R^2 = 0.9937$) dan had pengesanan rendah sebanyak 7.384 pM. Kebolehasilan biosensor ($n=8$) diperoleh ialah antara 2.65% - 12.23% dan adalah selektif terhadap molekul E2 berbanding dengan tindak balas terhadap sebatian EDC yang lain. Selain itu, biosensor yang dihasilkan telah berjaya mengesan kepekatan E2 yang ditambah ke dalam sampel air sungai dengan peratusan pemulihan yang tinggi di antara 92.5 dan 97.2%. Oleh itu, biosensor yang dibangunkan ini berfungsi dengan baik dalam mengesan dan memantau kepekatan E2 dalam sampel air.

Kata kunci: Aptamer; biosensor; metakrilat-akrlat; polimer berfungsi; 17β -estradiol

ABSTRACT

17β -estradiol (E2) is an endocrine-disrupting chemical (EDC) that is often studied due to its compound excretion largely by humans through the excretion process and released back into the water system, without proper monitoring by water treatment plants. Abnormal E2 levels can cause health problems such as weak bones (osteoporosis) and fertility problems due to unstable hormone levels. To ensure early detection and proper management of these conditions, continuous biosensing of E2 levels is essential for maintaining stable hormone levels and overall health. An alternative approach was taken by combining electrochemical sensors with 76-mer aptamers of E2 specific sequence, which were shown to have high affinity binding to E2. Methacrylate-acrylate polymer with a microsphere structure was utilized to increase the concentration of the immobilized aptamer and increasing the sensitivity of the sensor without the need for amplification by conductive materials. This research developed an electrochemical biosensor for detecting 17β -estradiol (E2) using a methacrylate-acrylate-modified polymer. Functionalized poly(glycidyl methacrylate-*co*-*n*-butyl acrylate) with a volume ratio of 90:10 in the form of microspheres acts as a matrix for covalent immobilization of E2-aptamer. Based on the electrochemical analysis, the developed 17β -estradiol (E2) biosensor based on aptamer has successfully shown a linear sensitivity range between 0.1 nM - 1.0 μ M ($R^2 = 0.9937$) and a low detection limit of 7.384 pM. Biosensor reproducibility ($n=8$) was obtained between 2.65% - 12.23% and was selective towards the E2 molecule compared to the response of other EDC compounds. Additionally, the produced biosensor had successfully detected the E2 spiked concentrations in the river

water sample with a high recovery percentage between 92.5 - and 97.2%. Therefore, the developed biosensor performs well in detecting and monitoring the concentration of E2 in water samples.

Keywords: Aptamer; biosensor; functional polymer; methacrylate-acrylate; 17 β -estradiol

PENGENALAN

Bahan kimia pengganggu endokrin (EDC) merupakan sebatian yang boleh menyerupai hormon semula jadi dalam organisma dan terlibat dalam banyak proses biologi seperti pertumbuhan sel. Ini kerana, EDC boleh mencetuskan tindak balas yang tidak dikehendaki oleh organisma hidup seperti proses pengawalan tahap hormon biologi dan boleh menyebabkan masalah kesihatan (Lobstein & Brownell 2021). Semenjak EDC dikenal pasti sebagai bahan hormon sintetik, ia telah dapat dikesan di Eropah, Asia dan Afrika Selatan (Haron et al. 2022; Kasonga et al. 2021; Wilkinson et al. 2017). Agensi Alam Sekitar Eropah (EPA) telah mengelaskan bahan kimia estrogen pengganggu endokrin (eEDCs) seperti 17 β -estradiol (E2) dan 17 α -etinin estradiol (EE2) dalam senarai bahan kimia pencemaran yang perlu dipantau (European Parliament 2015, 2013). Ini kerana, bahan ini berupaya menjejaskan proses biologi sistem pembiakan manusia dan haiwan (Inaba, Hara & Horiuchi 2020; Tofovic & Jackson 2020). Teknik pengesanan EDC secara konvensional yang menggunakan kromatografi cecair berprestasi tinggi (HPLC) atau kromatografi gas (GC) memang terbukti mempunyai ketepatan tinggi namun mempunyai beberapa kelemahan seperti had pengesanan yang rendah, peralatan besar dan memerlukan operator terlatih (Newman et al. 2022; Yakupova et al. 2022).

Oleh itu, pengesanan EDC estrogen yang menggunakan biosensor elektrokimia berasaskan aptamer banyak dibangunkan dan dibuktikan mempunyai prestasi analisis yang sangat baik dari aspek had pengesanan rendah, selektiviti, proses penghasilan mudah serta kos bahan yang rendah (Reano & Escobar 2024). Aptamer adalah helaian tunggal DNA (ssDNA) atau RNA sintetik mudah diubah suai untuk pengesanan pelbagai jenis analit dan mempunyai kestabilan fizikal tinggi serta interaksi khusus dengan analit (Eisold & Labudde 2018). Penemuan ssDNA (76-mer) dengan pemalar pemisahan (K_d) sebanyak 130 nM daripada evolusi ligan sistematik melalui pengayaan eksponen (SELEX) oleh Kim et al. (2007) sering digunakan dalam pembangunan biosensor berasaskan aptamer untuk pengesanan E2 dengan pembaharuan dari segi ubah suai pemotongan panjang aptamer (*truncation*) untuk meningkatkan kepekaan dan kestabilan fizikal sensor (Qiao et al. 2021; Zhang & Liu 2020). Walaupun begitu, masih banyak faktor yang perlu dititikberatkan dalam fabrikasi aptasensor seperti pemilihan bahan pemegun, struktur bahan dan kaedah pemegunan aptamer.

Bahan polimer glisidil metakrilat-*ko*-n-butyl akrilat menunjukkan potensi polimer yang sesuai untuk digunakan sebagai matriks pemegunan kerana mempunyai struktur dan permukaan polimer boleh ubah. Selain itu, bergantung

kepada jenis monomer yang digunakan, polimer mengandungi pelbagai jenis kumpulan berfungsi seperti alkohol, asid karbosilik, amina dan epoksida (Futra et al. 2016; Mazlan & Hanifah 2014; Rahman et al. 2017; Zhu et al. 2015). Tambahan lagi, reseptor biologi dapat dipegun secara kovalen kepada matriks polimer untuk menghasilkan biosensor yang mempunyai kestabilan fizikal yang tinggi (Ali, Elsherbiny & Emara 2019), jika dibandingkan dengan pemegunan secara penjerapan kimia di antara aptamer berfungsi tiol dan bahan pemegun nanozarah logam konduktif (Huang et al. 2014; Ke et al. 2014). Oleh yang demikian, kajian ini dilakukan untuk menghasilkan biosensor elektrokimia berasaskan E2-aptamer sebagai prob biologi dan polimer glisidil metakrilat-*ko*-n-butyl akrilat untuk mengesan E2. Aptasensor yang dibangunkan ini akan menyumbang ke arah pengesanan EDC dalam persekitaran secara *in situ* kerana aptasensor elektrokimia mempunyai julat pengesanan yang tinggi dan dapat mengukur kepekatan analit secara kuantitatif berbanding sensor optikal yang sering digunakan secara kualitatif serta memerlukan peralatan khusus untuk mengukur kepekatan analit secara kuantitatif (Shubhangi et al. 2024).

BAHAN DAN KAEDAH

Bahan kimia dan peralatan yang digunakan dalam penghasilan biosensor elektrokimia E2-aptamer (76-mer) (5-GCTTCCAGCTTATTGAATTACACGCAGAG TTGCTGCGCGCTGAAGCGCGGAAGCGCGGAAGC-3) (Macrogen), n-Butyl akrilat (nBA) 99.0% (Sigma Aldrich), glisidil metakrilat (GMA) 97.0% (Sigma Aldrich), 2,2-dimetoksi-2-fenilasetofenon (DMPP) 99.0% (Sigma Aldrich), 1,6-heksanadiol diakrilat (HDDA) 95.0% (Sigma Aldrich), sodium dodesil sulfat (SDS) 99.0% (Merck), glutaraldehid 50.0% (Merck), tris-HCl 99.0% (Sigma Aldrich), magnesium klorida 97.0% (Fisher Chemical), kalium klorida 99.8% (Fisher Chemical), larutan ammonium 30.0% (R&M Chemical), etanol 95.0% (R&M Chemical), kalium ferrosianida 98.5-102.0% (Sigma Aldrich), 17 β -estradiol 98.0% (Acros Organic), estron 99.0% (Sigma Aldrich), estriol 97.0% (Acros Organic), progesteron 98.0% (Acros Organic), 17 α -etinin estradiol 98.0% (Acros Organic), bisfenol A 97.0% (Sigma Aldrich). Peralatan, sonikator (Elmasonic), elektrod bercetak skrin (SPE) (Srint Technology (M) Sdn. Bhd), *attenuated total reflection-FTIR* (ATR-FTIR) (Agilent Cary 630 FTIR Spectrometer), meter pH (Metrohm), plat pemanas dan pemutar magnet (Cimarec), neraca penimbang (Sortorius), BiPotentiostat (DropSens ustat400), mikroskop elektron pengimbasan pancaran medan (FESEM) (Zeiss/MERLIN) dan alat pengempar (HERMLE).

SINTESIS MIKROSFERA POLI(GMA-*ko*-nBA)

Larutan monomer GMA dan nBA dengan nisbah 90:10 (berat%) ditambah ke dalam tiub uji yang mengandungi 10 mL air ternyahion, 0.4 mL larutan HDDA, 0.09 mg pemula radikal DMPP dan 0.1 g surfaktan SDS. Campuran ini disonikasi selama 15 minit atau sehingga larutan berwarna putih susu terbentuk. Larutan ini kemudiannya didedahkan pada sumber cahaya ultra lembayung ($\lambda = 350 \text{ nm}$) serta aliran gas nitrogen yang berterusan selama 5 minit. Seterusnya, campuran terhasil kemudiannya dipindahkan ke tiub empar dan ditambah dengan larutan penimbal fosfat (0.05 M, pH 7) dan diemparkan pada kelajuan 4000 rpm selama 10 minit. Larutan sisa ini dibuang untuk meninggalkan mendakan tidak berwarna di dalam tiub empar. Mendakan ini dibasuh semula dengan larutan penimbal fosfat dan air ternyahion. Mendakan mikrosfera yang diperolehi dikeringkan di dalam balang pengering vakum pada suhu bilik dan disimpan pada suhu $4 \text{ }^\circ\text{C}$.

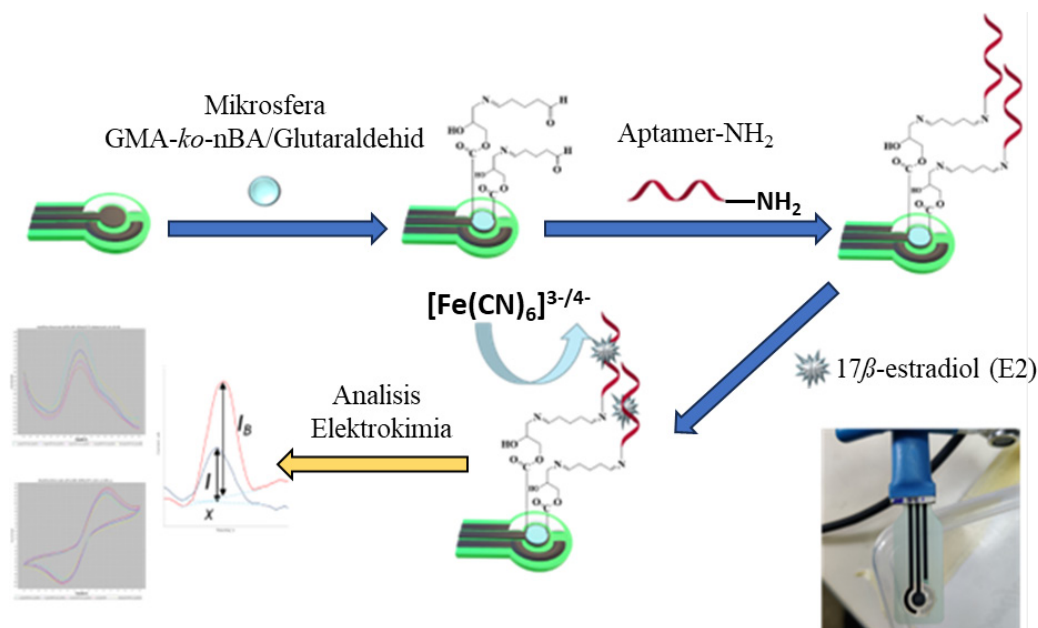
UBAH SUAI KUMPULAN BERFUNGSI PADA MIKROSFERA

Mendakan mikrosfera diubah suai dengan tindak balas pengaminan dan penambahan kumpulan aktif dwi-fungsi glutaraldehyd. Untuk tindak balas pengaminan, sebanyak 1.5 g serbuk mikrosfera disebar ke dalam 40 mL larutan ammonia (0.5 M) dan dikacau pada suhu $65 \text{ }^\circ\text{C}$ selama 5 jam. Setelah suhu campuran mencapai suhu bilik, campuran diempar pada kelajuan 4000 rpm selama 10 minit. Mikrosfera beramina dipindahkan dan dikeringkan.

Seterusnya, sebanyak 20 mL larutan glutaraldehyd (0.5 M) dimasukkan ke dalam bikar bersama 0.5 g mikrosfera beramina dan dibiarkan selama 24 jam pada suhu $25 \text{ }^\circ\text{C}$ dengan pengacauan berterusan. Selepas 24 jam, mendakan dibasuh dengan menggunakan air ternyahion dan dibilas sebanyak dua kali dengan larutan penimbal 0.1 M kalium fosfat (pH 7). Mendakan mikrosfera berfungsi aldehyd kemudiannya dikeringkan dan disimpan dalam bekas bertutup pada suhu bilik.

FABRIKASI APTASENSOR 17β -ESTRADIOL

Fabrikasi aptasensor 17β -estradiol (E2) dilakukan dengan menyalut elektrod bercetak skrin (SPE) dengan mikrosfera berfungsi glutaraldehyd dan difungsikan dengan E2-aptamer (Rajah 1). Larutan mikrosfera berkepekatan $0.1 \text{ mg } \mu\text{L}^{-1}$ disediakan menggunakan larutan etanol:air (7:3). Seterusnya, $5.0 \text{ } \mu\text{L}$ larutan ini dititiskan pada permukaan elektrod kerja SPE dan dikeringkan pada suhu bilik selama 30 minit. Setelah itu, SPE bersalut mikrosfera kemudiannya dititiskan dengan larutan E2-aptamer berkepekatan $5 \text{ } \mu\text{M}$ dan dibiarkan untuk bertindak balas selama 12 jam. Elektrod yang telah diubah suai dibasuh dengan menggunakan larutan penimbal Tris-HCl (pH 7.5). Seterusnya, elektrod kerja diinkubasi dengan $5 \text{ } \mu\text{L}$ larutan E2 berkepekatan 1 pM sehingga 10 mM selama 30 minit. Selepas itu, SPE dititiskan dengan larutan penimbal tris-HCl (0.1 M, pH 7.5) yang mengandungi 5 mM kalium ferisianida, ($\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$) dan sedia dianalisis menggunakan teknik voltametri.



RAJAH 1. Fabrikasi biosensor 17β -estradiol (E2) berasaskan aptamer beramina menggunakan polimer GMA-*ko*-nBA/Glutaraldehyd

KEPUTUSAN DAN PERBINCANGAN

PENENTUAN KUMPULAN BERFUNGSI PROSES
PEMPOLIMERAN EMULSI

Kumpulan berfungsi bagi setiap mikrosfera yang disintesis ditentukan menggunakan alat IM pada julat nombor gelombang 4000-650 cm^{-1} . Setiap kumpulan berfungsi mempunyai tenaga getaran masing-masing (Pavia et al. 2008). Rajah 2 menunjukkan perbandingan kumpulan berfungsi bagi kopolimer poli(GMA-ko-nBA) dan monomer GMA serta nBA. Berdasarkan hasil analisis spektra inframerah, kopolimer berjaya dihasilkan dengan kehilangan puncak penyerapan dwi-ikatan karbon (C=C) pada 1637 cm^{-1} bagi sampel kopolimer berbanding spektra monomer. Selain itu, kopolimer yang terhasil juga menunjukkan kehadiran kumpulan epoksida pada nombor gelombang 840 - 904 cm^{-1} dan ia sama dengan spektra monomer GMA.

UBAH SUAI KUMPULAN BERFUNGSI PADA MIKROSFERA

Analisis FTIR digunakan untuk menganalisis hasil tindak balas pengaminaan antara polimer GMA-ko-nBA dan larutan ammonia. Kumpulan berfungsi alkohol dapat dilihat pada julat bacaan nombor gelombang 3620 - 3238 cm^{-1} yang disebabkan oleh getaran regangan kumpulan berfungsi (-O-H) hasil daripada pembukaan gelang epoksida (Rajah 3). Di samping itu, puncak keamatan dan nombor gelombang kumpulan amina primer sukar dilihat kerana bertindih dengan spektrum alkohol pada nombor gelombang (3250 - 3400 cm^{-1}). Perubahan ketara juga dilihat pada pengurangan tinggi puncak kumpulan epoksida sebatian polimer GMA-ko-nBA/ NH_2 pada julat 840 - 904 cm^{-1} . Hal ini kerana tidak semua kumpulan aktif epoksida dapat bertindak balas dengan molekul ammonia kerana terlindung daripada permukaan mikrosfera (Baryamoglu et al. 2005).

Pengikatan molekul aktif dwifungsi glutaraldehid kepada mikrosfera beramina dicirikan menggunakan kaedah voltametri berkitar (CV). Berdasarkan voltamogram, terdapat peningkatan dalam nilai keupayaan mikrosfera berfungsi glutaraldehid berbanding dengan mikrosfera berfungsi amina. Rajah 4 menunjukkan puncak keupayaan voltamogram (c) SPE/GMA-ko-nBA/glutaraldehid beranjak ke kanan (0.444 V) berbanding voltamogram (b) SPE/GMA-ko-nBA/ NH_2 (0.354 V). Ini disebabkan oleh peningkatan rintangan permukaan elektrod oleh kumpulan glutaraldehid yang bersifat hidrofobik menyebabkan jarak perjalanan ion prob redoks kepada permukaan transduser bertambah (Elgrishi et al. 2018).

MORFOLOGI PERMUKAAN MIKROSFERA

Morfologi permukaan mikrosfera yang disintesis ditentukan oleh mikroskop elektron pengimbasan pancaran medan (FESEM). Dua sampel disediakan iaitu (A) poli(GMA-ko-nBA)(8:2), poli(M82) dan (B) poli(GMA-

ko-nBA)(9:1), poli(M91). Rajah 5 adalah mikrograf yang menunjukkan perbezaan saiz diameter yang ketara antara mikrosfera poli(M82) dan poli(M91) pada skala pembesaran 1000 \times . Morfologi permukaan bagi sampel (B) menunjukkan mikrosfera yang dihasilkan berbentuk sfera dengan taburan saiz antara 1.05 - 7.24 μm . Pemerhatian ini sama dengan saiz taburan mikrosfera yang dilaporkan oleh Mazlan dan Hanifah (2014) dan taburan saiz mikrosfera dengan nisbah GMA:nBA (8:2) mempunyai peratusan saiz yang besar jika dibandingkan dengan mikrosfera bernisbah 9:1 iaitu sebanyak 60% pada julat saiz (0.09 - 7.0 μm). Ini kerana, peratusan larutan nBA yang tinggi menyebabkan saiz misel menjadi tidak stabil dan mudah untuk bertukar kepada titisan yang lebih besar semasa pemfotopolimeran.

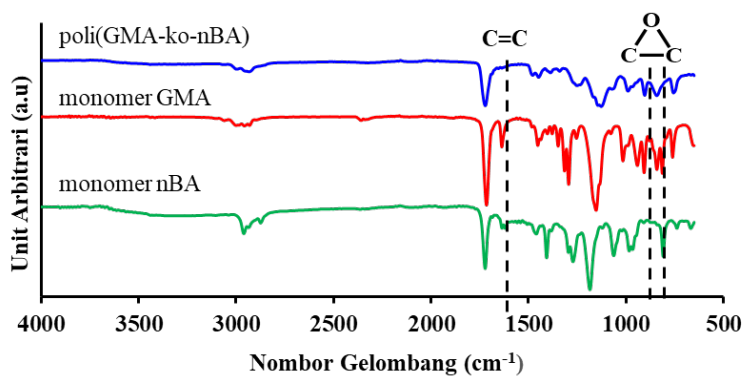
ANALISIS VOLTAMETRI BERKITAR (CV) APTASENSOR

17 β -ESTRADIOL BERASASKAN MIKROSFERA

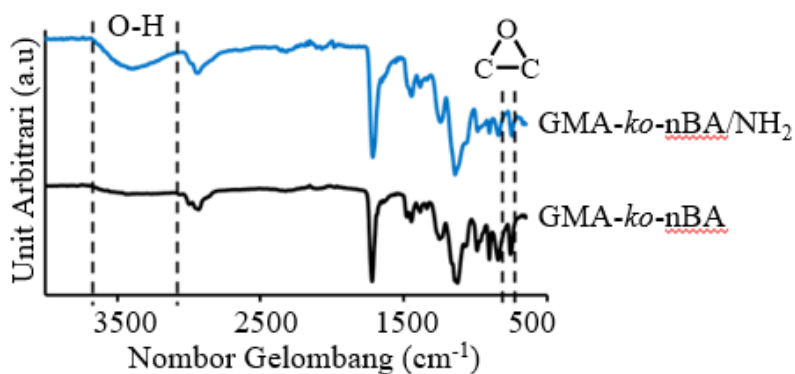
METAKRILAT-AKRILAT

Setiap lapisan ubah suai sensor dianalisis menggunakan voltametri berkitar (CV) dengan kadar imbasan 0.05 V/s pada julat keupayaan -0.8 V hingga +0.8 V berserta elektrod rujukan Ag/AgCl. Rajah 6 menunjukkan voltamogram elektrod (a) SPE kosong, (b) SPE/GMA-ko-nBA, (c) SPE/ SPE/GMA-ko-nBA/ NH_2 , (d) SPE/GMA-ko-nBA/glutaraldehid dan (e) SPE/GMA-ko-nBA/aptamer di dalam 0.1 M larutan penimbal Tris-HCl pada pH 7.5 serta 5 mM larutan kalium ferrosianida, ($\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$) sebagai prob redoks. Hasil pengoksidaan dan penurunan pada voltamogram berlaku disebabkan berlakunya peralihan elektron daripada molekul prob kepada elektrod dan sebaliknya hasil daripada medan keupayaan elektrik yang dihasilkan oleh alat potentiostat.

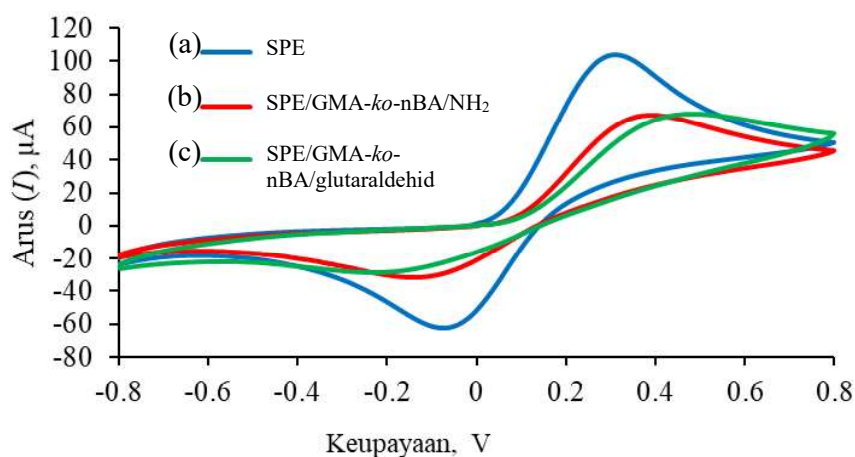
Berdasarkan Rajah 6, SPE kosong (a) menunjukkan puncak anodik dengan arus tertinggi (103.8 μA) pada keupayaan 0.316 V. Seterusnya berlaku penurunan puncak anodik bagi setiap jenis elektrod dengan setiap lapisan yang ditambah. Untuk ubah suai terakhir elektrod (d) SPE/GMA-ko-nBA/aptamer, ubah suai ini menyebabkan berlakunya penurunan puncak anodik yang paling ketara dengan arus terendah 58.2 μA . Hal ini menunjukkan bahawa aptamer telah berjaya dipegunkan kepada mikrosfera secara ikatan kovalen melalui tindak balas bes Schiff (Song et al. 2023; Taib et al. 2020; Zaid et al. 2020). Penurunan arus di dalam kajian ini juga boleh dibandingkan dengan hasil kajian yang dilakukan oleh Rather, Khudaish dan Kannan (2018) dengan voltamogram yang terhasil mempunyai penurunan arus yang ketara apabila elektrod dipegunkan dengan aptamer. Hal ini berlaku disebabkan oleh penolakan elektrostatik antara ion prob ($[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$) yang bercas negatif dengan rangkaian tulang belakang fosfat yang bercas negatif pada aptamer yang melambatkan proses penyerapan ion prob kepada permukaan elektrod (Nameghi et al. 2019). Peningkatan nilai keupayaan dan rintangan peralihan elektron yang mengganggu pembentukan awal lapisan penyebaran prob redoks menyebabkan anjakan voltamogram ke kanan (Elgrishi et al. 2018).



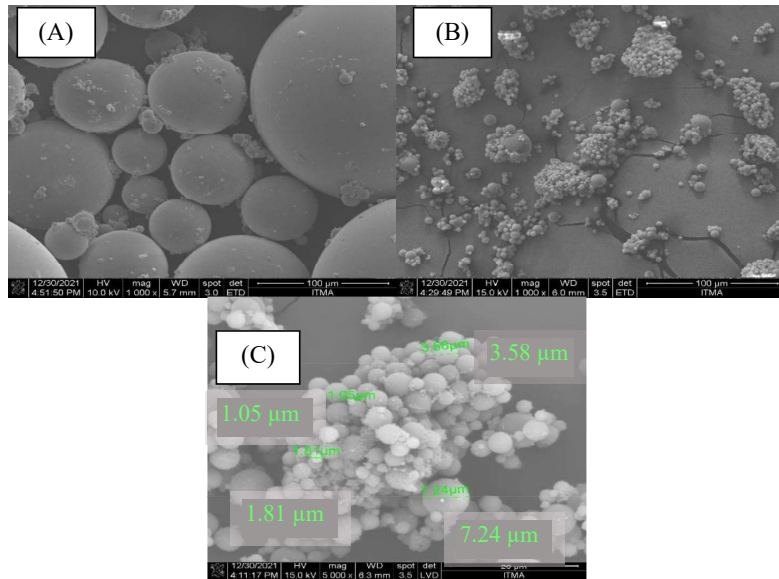
RAJAH 2. Perbandingan spektrum FTIR polimer GMA-ko-nBA, monomer GMA dan monomer nBA



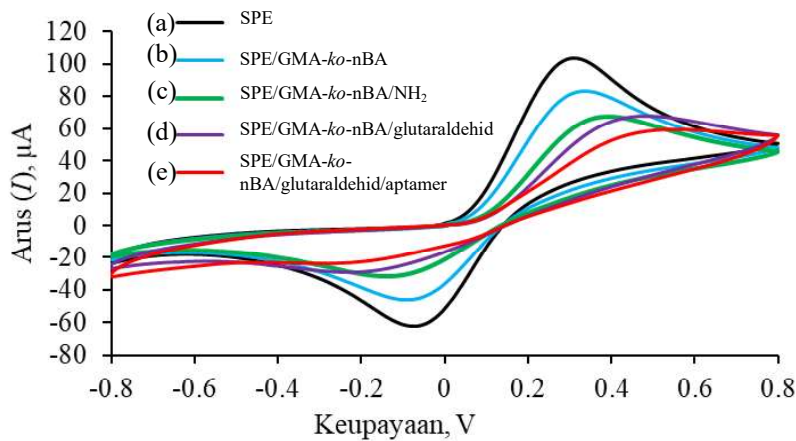
RAJAH 3. Perbandingan spektrum FTIR polimer beramina GMA-ko-nBA/NH₂ dan polimer GMA-ko-nBA



RAJAH 4. Voltamogram voltametri berkitar bagi (a) SPE, (b) SPE/GMA-ko-nBA/NH₂ dan (c) SPE/GMA-ko-nBA/glutaraldehyd di dalam 0.1 M larutan penimbal tris-HCl pada pH 7.5 serta 5 mM larutan kalium ferrosianida, (K₄[Fe(CN)₆]) sebagai prob redoks



RAJAH 5. Mikrograf perbezaan saiz mikrosfera (A) poli(M82) dan (B) poli(M91) pada skala pembesaran 1000× dan ukuran saiz mikrosfera (C) poli(M91) pada skala pembesaran 5000×

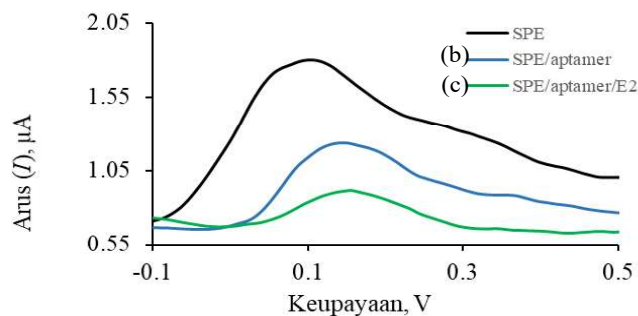


RAJAH 6. Voltamogram bagi (a) SPE, (b) SPE/GMA-ko-nBA, (c) SPE/GMA-ko-nBA/NH₂, (d) SPE/GMA-ko-nBA/glutaraldehyd dan (e) SPE/GMA-ko-nBA/glutaraldehyd/aptamer dalam 0.1 M larutan penimbal tris-HCl pada pH 7.5 serta 5 mM larutan kalium ferisianida, (K₄[Fe(CN)₆]) sebagai prob redoks

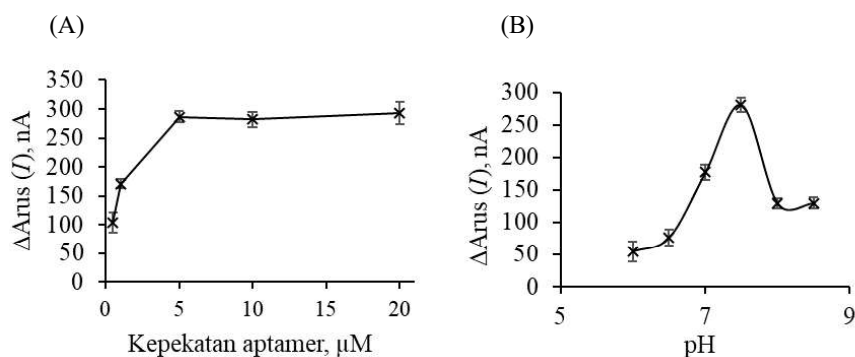
PENCIRIAN VOLTAMETRI DENYUT PEMBEZAAN (DPV)
TERHADAP ELEKTROD BIOSENSOR

Kaedah voltametri denyut pembezaan (DPV) digunakan untuk menguji kebolehan sensor untuk mengesan analit E2. Rajah 7 menunjukkan voltamogram elektrod SPE kosong (a), SPE/GMA-ko-nBA/aptamer (b) dan SPE/GMA-ko-nBA/aptamer/E2 (c) di dalam 0.1 M larutan penimbal tris-HCl pada pH 7.5 serta 5 mM larutan kalium ferisianida. Elektrod (c) adalah aptasensor yang diinkubasi dengan 1.0 μM analit E2. Berdasarkan kajian yang dilakukan, berlakunya profil penurunan arus dari elektrod

SPE kosong (a) sebanyak 1.80 μA kepada elektrod yang diubah suai dengan aptamer (b) sebanyak 1.24 μA yang mungkin disebabkan oleh mikrosfera yang tidak konduktif dan peningkatan penolakan elektrostatik prob redoks oleh rangkaian fosfat tulang belakang aptamer (Mazlan & Hanifah 2014; Rather, Khudaish & Kannan 2018; Ulianas et al. 2012). Ini seterusnya menurunkan kadar peralihan cas prob redoks serta elektron dan menyebabkan berlakunya penurunan arus yang ketara. Corak penurunan arus puncak pengoksidaan prob redoks yang sama juga berlaku apabila analit E2 ditambah kepada sensor (c) sebanyak



RAJAH 7. Voltamogram elektrod (a) SPE kosong, (b) SPE/GMA-*ko*-nBA/aptamer dan (c) SPE/GMA-*ko*-nBA/aptamer/E2 ($1 \mu\text{M}$) di dalam 0.1 M larutan penimbal tris-HCl pada pH 7.5 serta 5 mM larutan kalium ferisianida



RAJAH 8. (A) Kesan kepekatan aptamer yang dipegunkan pada 0.5 mg mikrosfera ($n=5$) dan (B) kesan julat pH larutan penimbal tris-HCl terhadap rangsangan aptasensor ($n=5$). Pengesanan dilakukan dalam $1.0 \mu\text{M}$ larutan 17β -estradiol (E2) yang dilarutkan dalam penimbal tris-HCl pada pH 7.5 dengan kehadiran 5 mM larutan kalium ferisianida

JADUAL 1. Perbandingan prestasi sensor elektrokimia pengesanan E2

Bahan	Julat linear	LOD	Rujukan
Poli(MAA)	$1.0 \times 10^{-15} - 1.0 \times 10^{-6} \text{ M}$	$2.5 \times 10^{-16} \text{ M}$	Futra et al. (2016)
Poli(Py- <i>ko</i> -PAA)	$1.0 \times 10^{-15} - 1.0 \times 10^{-6}$	$1.0 \times 10^{-15} \text{ M}$	Zhu et al. (2015)
ERGO/GCE	$1.0 \times 10^{-15} - 0.23 \times 10^{-9}$	$0.5 \times 10^{-15} \text{ M}$	Rather, Khudaish & Kannan (2018)
Poli(GMA- <i>ko</i> -nBA)	$1.0 \times 10^{-10} - 0.23 \times 10^{-6}$	7.384×10^{-12}	Kajian ini

JADUAL 2. Perolehan semula biosensor 17β -estradiol (E2) dalam sampel air sungai

Sampel	Kepekatan E2 yang ditambah/nM	Kepekatan E2 yang dikesan/nM	Perolehan semula (%)	RSD (%) $n=3$
Air Sungai	0	Tidak dikesan	-	-
	10	9.252	92.5	1.83
	50	49.097	98.2	2.58
	100	97.176	97.2	2.23

0.92 μ A. Hal ini kerana apabila berlakunya interaksi antara aptamer dan E2, rantaian aptamer akan mula melakukan konformasi struktur lipatan untuk memerangkap E2 (Eisold & Labudde 2018). Kesan daripada konformasi struktur lipatan ini adalah penutupan permukaan elektrod oleh rantaian aptamer (Nameghi et al. 2019) yang seterusnya mengganggu kadar peralihan cas serta elektron dan menyebabkan arus rangsangan elektrod menurun. Tindak balas pengikatan atau interaksi antara aptamer dengan analit E2 berkemungkinan disebabkan oleh interaksi hidrofobik dan ikatan hidrogen (Eisold & Labudde 2018; Futra et al. 2016).

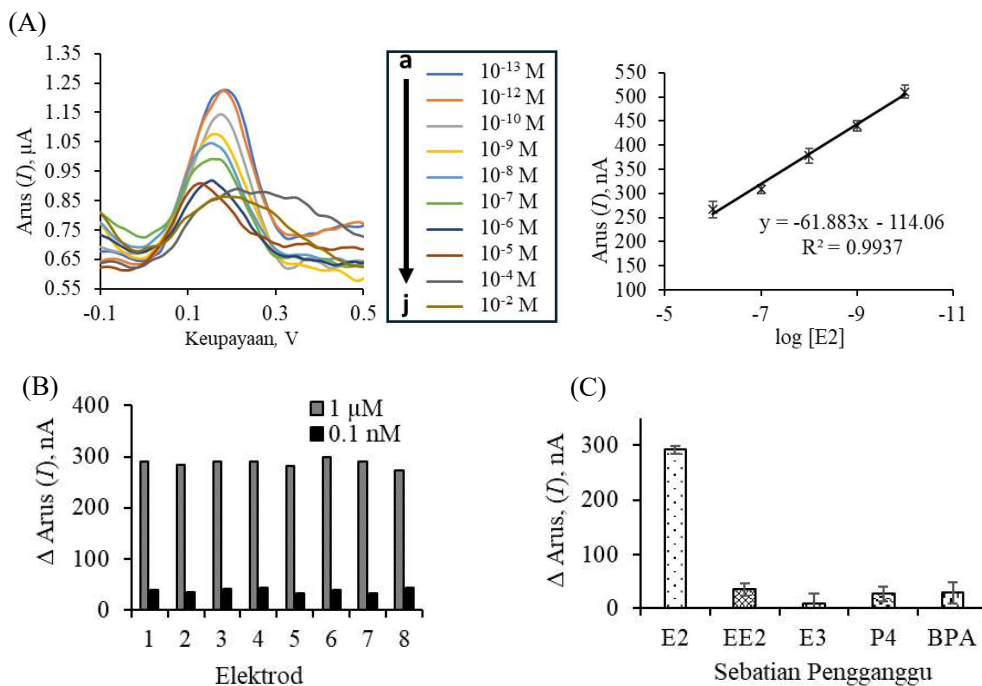
PENGOPTIMUMAN PARAMETER BIOSENSOR E2 MENGGUNAKAN DPV

Pengoptimuman parameter aptasensor seperti kepekatan aptamer dan nilai pH larutan penimbal mempengaruhi bacaan sensor elektrokimia (Rajah 8). Nilai optimum kepekatan aptamer pegun adalah 5.0 μ M (Rajah 8(A)). Pada kepekatan ini, aptamer mempunyai ruang untuk melakukan konformasi lipatan optimum (tidak padat dan

mengekalkan keanjalan rantaian aptamer) untuk bertindak balas dengan analit secara berkesan (Beitollahi et al. 2020; Rozi et al. 2022). Nilai pH yang optimum larutan penimbal Tris-HCl pula adalah pada pH 7.5 (Rajah 8(B)). Ini mungkin disebabkan oleh kadar pemprotonan aptamer dan analit adalah pada keadaan optimum yang dapat memastikan kestabilan fizikal aptamer untuk bertindak balas dengan analit secara berkesan (Belleperche & DeRosa 2018; Nishio, Tsukakoshi & Ikebukuro 2021; Taib et al. 2020).

PRESTASI BIOSENSOR 17 β -ESTRADIOL (E2)

Prestasi biosensor E2 ditentukan berdasarkan julat rangsangan linear, had pengesanan terendah (LOD), kebolehasilan, selektifan, kestabilan (Rajah 10) dan perolehan semula. Julat rangsangan linear dan had pengesanan bagi aptasensor pengesanan E2 ditentukan menggunakan DPV pada keadaan optimum dengan siri kepekatan E2 dari 0.1 pM - 10.0 mM (a - j). Arus puncak DPV semakin menurun apabila kepekatan analit meningkat. Prestasi aptasensor memuaskan dengan julat linear arus relatif yang lebar iaitu 0.1 nM - 1.0 μ M dengan



RAJAH 10. (A) Rangsangan DPV terhadap kepekatan E2 dari (a) 0.1 pM kepada (g) 10.0 mM dan julat rangsangan linear pada keadaan optimum di dalam 0.1 M larutan penimbal tris-HCl (pH 7.5) dengan kehadiran 5 mM kalium ferisianida. (B) Kebolehasilan biosensor 17 β -estradiol (E2) (n=8) pada keadaan optimum dengan kehadiran 5 mM kalium ferisianida. (C) Kesan rangsangan arus DPV terhadap beberapa jenis sebatian pengganggu dengan kepekatan 1.0 μ M (n=3) dalam keadaan optimum dengan kehadiran 5 mM kalium ferisianida

pekali regresi, $R^2 = 0.9937$ ($n=5$) (Rajah 10(A)). Had pengesanan terendah (LOD) pula adalah sebanyak 7.384 pM. Keputusan LOD ini hampir dengan kajian sensor elektrokimia pengesanan E2 pada julat sensitif pikomolar dan femtomolar (Jadual 1).

Seterusnya, adalah prestasi keboleholungan biosensor (Rajah 10(B)) untuk dua kepekatan E2 yang terpilih memberikan nilai sisihan piawai relatif (RSD) iaitu 2.65% ($n=8$) bagi kepekatan E2 tertinggi (1.0 μM) dan 12.23% ($n=8$) bagi kepekatan E2 terendah (0.1 nM). Sebagai perbandingan, nilai RSD biosensor yang dibangunkan oleh Rozi et al. (2021) menggunakan mikrosfera poli(metakrilik asid-*ko*-n-butyl akrilat) adalah antara 1.48 - 1.55% ($n=5$) pada kepekatan 10 nM & 1 nM analit E2. Berdasarkan RSD ini, biosensor yang direka bentuk mempunyai prestasi baik untuk pengesanan E2 pada kepekatan 1.0 μM berbanding kepekatan 0.1 nM untuk setiap uji kaji.

Seterusnya, perubahan arus yang signifikan sebanyak 97.2% (291.6 nA) untuk analit E2 berbanding sebatian pengganggu lain seperti estriol (E3) (8.18 nA), 17 α -etinilestradiol (EE2), progesteron (P4) dan bisfenol A (BPA) pada kepekatan sama (1.0 μM) menunjukkan prestasi keselektifan biosensor adalah terhadap E2 sahaja (Rajah 10(C)). Pemerhatian ini seiring dengan kajian oleh Kim et al. (2007) dan Olowu et al. (2010) yang menggunakan turutan aptamer (76-mer) yang sama untuk pengesanan E2 dengan peratusan perbezaan rangsangan sebanyak ~51.8% dan ~66.7%.

Analisis terakhir untuk prestasi biosensor adalah kajian perolehan semula dalam sampel air sungai dilakukan dengan kaedah penambahan piawai (Jadual 2). Peratusan perolehan E2 yang ditambah kepada air sungai pada tiga kepekatan berbeza menunjukkan nilai peratusan perolehan antara 92.5% sehingga 98.2% dengan julat nilai relatif sisihan piawai yang rendah (1.83% - 2.58%). Kajian terdahulu turut menyokong hasil kajian ini dengan Nameghi et al. (2019) melaporkan peratus perolehan semula antara 92.1% - 102.0% dengan menggunakan aptamer yang lebih pendek dan dibantu bahan konduktif. Tahap perolehan semula ini menunjukkan bahawa aptasensor yang dibangunkan boleh digunakan untuk menganalisis kepekatan E2 dalam pelbagai jenis sampel air.

KESIMPULAN

Mikrosfera metakrilat-akrilat (M91) secara fotopemolimeran emulsi dengan menggunakan 90% monomer glisidil metakrilat (GMA) dan 10% n-butyl akrilat (nBA) telah berjaya dihasilkan. Analisis ubah suai kumpulan berfungsi pada mikrosfera dan analisis morfologi mikrosfera menunjukkan perubahan kumpulan berfungsi yang sesuai untuk pemegangan aptamer secara kovalen. Pada keadaan optimum, julat linear aptasensor ini adalah pada 0.1 nM - 1.0 μM dengan had pengesanan terendah 7.384 pM. Kebolehasilan biosensor diperolehi antara 2.65 % -

12.23 % ($n=8$). Aptasensor ini bersifat selektif terhadap E2 dengan menunjukkan perbezaan arus yang ketara. Kajian perolehan semula pengesanan E2 dalam sampel air sebenar menunjukkan bacaan yang tinggi iaitu antara 92.5 - 98.2 %. Tambahan itu, kajian untuk meningkatkan kekuatan ikatan kovalen antara matriks berfungsi dan aptamer juga dapat dilakukan untuk meningkatkan kestabilan fizikal sensor yang dibangunkan dengan menggunakan kaedah tindak balas gandingan-karbodiimida berbanding dengan tindak balas bes Schiff (Saha et al. 2024; Yu et al. 2023).

PENGHARGAAN

Pengarang mengucapkan terima kasih kepada Universiti Kebangsaan Malaysia kerana telah membiayai penyelidikan ini melalui Geran Universiti Penyelidikan (GUP-2021-053) dan Pusat Penyelidikan Instrumentasi dan Inovasi (CRIM-UKM) yang menyediakan prasarana penyelidikan.

RUJUKAN

- Ali, M.H., Elsherbiny, M. & Emara, M. 2019. Updates on aptamer research. *International Journal of Molecular Sciences* 20(10): 2511.
- Baryamoglu, G., Kaya, B. & Yakup Arica, M. 2005. Immobilization of *Candida Rugosa* Lipase onto Spacer-Arm Attached Poly(GMA-HEMA-EDGMA) Microsphere. *Food Chemistry* 92(2):261-268.
- Beitollahi, H., Zaimbashi, R., Mahani, M.T. & Tajik, S. 2020. A label-free aptasensor for highly sensitive detection of homocysteine based on gold nanoparticles. *Bioelectrochemistry* 134: 107497.
- Belleperche, M. & DeRosa, M.C. 2018. pH-Control in aptamer-based diagnostics, therapeutics, and analytical applications. *Pharmaceutical* 11(3): 80.
- Eisold, A. & Labudde, D. 2018. Detailed analysis of 17 β -estradiol-aptamer interactions: A molecular dynamics simulation study. *Molecules* 23(7): 1690.
- Elgrishi, N., Rountree, K.J., McCarthy, B.D., Rountree, E.S., Eisenhart, T.T. & Dempsey, J.L. 2018. A practical beginner's guide to cyclic voltammetry. *Journal of Chemical Education* 95: 197-206.
- European Parliament. 2015. Commission Implementing Decision (EU) 2015/495 establishing a watch list of substances for Union-wide monitoring in the field of water policy pursuant to Directive 2008/105/EC of the European Parliament and of the Council. *Journal of the European Union L* 78: 40-42.
- European Parliament. 2013. Directive 2013/39/EU of the European Parliament and of the Council amending Directives 2000/60/EC and 2008/105/EC as regards priority substances in the field of water policy. *Journal of the European Union L* 226: 1-17.

- Futra, D., Heng, L.Y., Jaapar, M.Z., Uliana, A., Saeedfar, K. & Ling, T.L. 2016. A novel electrochemical sensor for 17 β -estradiol from molecularly imprinted polymeric microspheres and multi-walled carbon nanotubes grafted with gold nanoparticles. *Analytical Methods* 8: 1381-1389.
- Haron, D.E.M., Yoneda, M., Hod, R., Wahab, M.I.A. & Aziz, M.Y. 2022. Perfluoroalkyl and polyfluoroalkyl substances, bisphenol and paraben compounds in dust collected from residential homes in Klang Valley, Malaysia. *Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal* 28: 827-843.
- Huang, K., Liu, Y.-J., Shi, G., Yang, X. & Liu, Y.-M. 2014. Label-free aptamer sensor for 17 β -estradiol based on vanadium disulfide nanoflowers and Au nanoparticles. *Sensors and Actuators B* 201: 579-585.
- Inaba, H., Hara, S. & Horiuchi, M. 2020. Gonadal expression profiles of sex-specific genes during early sexual differentiation in Japanese eel *Anguilla japonica*. *Fisheries Science* 87: 203-209.
- Kasonga, T.K., Coetzee, M.A.B., Kamika, I., Ngole-Jeme, V.M. & Momba, N.B. 2021. Endocrine-disruptive chemicals as contaminants of emerging concern in wastewater and surface water: A review. *Journal of Environmental Management* 277: 111485.
- Ke, H., Liu, M., Zhuang, L., Li, Z., Fan, L. & Zhao, G. 2014. A femtomolar level 17 β -estradiol electrochemical aptasensor constructed on hierarchical dendritic gold modified boron-doped diamond electrode. *Electrochimica Acta* 137: 146-153.
- Kim, Y.S., Jung, H.S., Matsura, T., Lee, H.Y., Kawai, T. & Gu, M.B. 2007. Electrochemical detection of 17 β -estradiol using DNA aptamer immobilized gold electrode chip. *Biosensors and Bioelectronics* 22(11): 2525-2531.
- Loebstein, T. & Brownell, K.D. 2021. Endocrine-disrupting chemicals and obesity risk: A review of recommendations for obesity prevention policies. *Obesity Reviews* 22(11): e13332.
- Mazlan, S.Z. & Hanifah, S.A. 2014. Synthesis and effect of modification on methacrylate - acrylate microspheres for *Trametes versicolor* laccase enzyme immobilization. *AIP Conference Proceedings* 1614: 263-268.
- Nameghi, M.A., Danesh, N.M., Ramezani, M., Alibolandi, M., Abnous, K. & Taghdisi, S. 2019. An ultrasensitive electrochemical sensor for 17 β -estradiol using split aptamers. *Analytica Chimica Acta* 1065: 107-112.
- Newman, M.S., Curran, A.D., Mayfield, B.P., Saltiel, D. & Stanczyk, F.Z. 2022. Assessment of estrogen exposure from transdermal estradiol gel therapy with a dried urine assay. *Steroids* 184: 109038.
- Nishio, M., Tsukakoshi, K. & Ikebukuro, K. 2021. G-quadruplex: Flexible conformational changes by cations, pH, crowding and its applications to biosensing. *Biosensors and Bioelectronics* 178: 113030.
- Olowu, R.A., Arotiba, O., Mailu, S.N., Baker, P. & Iwuoha, E. 2010. Electrochemical aptasensor for endocrine disrupting 17 β -estradiol based on a poly(3,4-ethylenedioxythiophene)-gold nanocomposite platform. *Sensors* 10(11): 9872-9890.
- Pavia, D.L., Lampman, G.M., Kriz, G.S. & Vyvyan, J.A. 2008. *Introduction to Spectroscopy*. Cengage Learning.
- Qiao, L., Wang, H., He, J., Yang, S. & Chen, A. 2021. Truncated affinity-improved aptamers for 17 β -estradiol determination by AuNPs-based colorimetric aptasensor. *Food Chemistry* 340: 128181.
- Rahman, M., Heng, L.Y., Futra, D., Chiang, C.P.C., Rashid, Z.A. & Ling, T.T. 2017. A highly sensitive electrochemical DNA biosensor from acrylic-gold nano-composite for the determination of Arowana fish gender. *Nanoscale Research Letters* 12: 484.
- Rather, J.A., Khudaish, E.A. & Kannan, P. 2018. Graphene-amplified femtosensitive aptasensing of estradiol, an endocrine disruptor. *Analyst* 143(8): 1835-1845.
- Reano, R.L. & Escobar, E.C. 2024. A review of antibody, aptamer, and nanomaterials synergistic systems for an amplified electrochemical signal. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* 12: 1361469.
- Rozi, N., Hanifah, S.A., Zaid, M.H.M., Karim, N.H.A. & Ikeda, M. 2021. Feasible study on poly(pyrrole-co-pyrrole-3-carboxylic acid)-modified electrode for detection of 17 β -estradiol. *Chemical Papers* 75(2): 3493-3503.
- Saha, N.K., Salvia, W.S., Konkolewicz, D. & Hartley, C.S. 2024. Transient covalent polymers through carbodiimide-driven assembly. *Angewandte Chemie* 138(31): e202404933.
- Song, J., Chen, S., Zhang, Q., Xi, X., Lei, H., Du, G. & Pizzi, A. 2023. Preparation and characterization of the bonding performance of a starch-based water resistance adhesive by Schiff base reaction. *International Journal of Biological Macromolecules* 251: 126254.
- Shubhangi, Nandi, I., Rai, S.K. & Chandra, P. 2024. MOF-based nanocomposites as transduction matrices for optical and electrochemical sensing. *Talanta* 266(Part 2): 125124.
- Taib, M., Tan, L.L., Karim, N.H.A., Ta, G.C., Heng, L.Y. & Khalid, B. 2020. Reflectance aptasensor based on metal salphen label for rapid and facile determination of insulin. *Talanta* 207: 120321.

- Tofovic, P.S. & Jackson, E.K. 2020. Estradiol metabolism: Crossroads in pulmonary arterial hypertension. *International Journal of Molecular Sciences* 21(1): 116.
- Ulianas, A., Lee, Y.H., Hanifah, S.A. & Tan, L.L. 2012. An electrochemical DNA microbiosensor based on succinimide-modified acrylic microspheres. *Sensors* 12: 5445-5460.
- Wilkinson, J.L., Hooda, P.S., Swinden, J., Barker, J. & Barton, S. 2017. Spatial distribution of organic contaminants in three rivers of southern England bound to suspended particulate material and dissolved in water. *Science Total Environmental* 487-497.
- Yakupova, Z.R., Lebedinets, S.A., Vakh, K.S., Garmonov, S.Y. & Bulatov, A.V. 2022. Microextraction of 17 β -estradiol from medicinal preparations for the subsequent determination by HPLC-UV. *Journal of Analytical Chemistry* 77: 342-346.
- Yu, Z., Li, Q., He, X., Wang, X., Wen, Y., Zeng, L., Yu, W., Hu, P. & Chen, H. 2023. A multifunctional hydrogel based on nature polysaccharide fabricated by Schiff base reaction. *European Polymer Journal* 197: 112330.
- Zaid, M.H.M., Abdullah, J., Rozi, M., Rozlan, A.A.M. & Hanifah, S.A. 2020. A sensitive impedimetric aptasensor based on carbon nanodots modified electrode for detection of 17 β -estradiol. *Nanomaterials* 10(7): 1346.
- Zhang, F. & Liu, J. 2020. Label-Free Colorimetric Biosensors Based on Aptamers and Gold Nanoparticles: A Critical Review. *Analysis & Sensing* 1(1):30-43.
- Zhu, B., Alsager, O.A., Kumar, S., Hodgkiss, J.M. & Travas-sejdic, J. 2015. Label-free electrochemical aptasensor for femtomolar detection of 17 β -estradiol. *Biosensors and Bioelectronics* 70: 398-403.

*Pengarang untuk surat-menyurat; email: sharina@ukm.edu.my