



FABRIKASI BIOSENSOR DNA PORSIN BERASASKAN KOMPLEKS RUTENIUM BIPIRIDINA

(Fabrication of Porcine DNA Biosensor Based on Ruthenium Bipyridine Complex)

Nurul Izni Abdullah Halid¹, Emma Izzati Zakariah¹, Lee Yook Heng¹, Nurul Huda Abd Karim¹, Haslina Ahmad², Siti Aishah Hasbullah^{1*}

¹Pusat Pengajian Sains Kimia dan Teknologi Makanan, Fakulti Sains dan Teknologi,
Universiti Kebangsaan Malaysia, 43600 UKM Bangi, Selangor, Malaysia

²Jabatan Kimia, Fakulti Sains,
Universiti Putra Malaysia, 43400 Serdang, Selangor, Malaysia

*Pengarang utama: aishah80@ukm.edu.my

Received: 17 February 2016; Accepted: 9 June 2016

Abstrak

Biosensor DNA elektrokimia bagi pengesanan jujukan DNA porsin berasaskan kompleks rutenium (II) sebagai label aktif redoks telah dibangunkan. Sistem biosensor difabrikasi berdasarkan elektrod bercetak skrin (SPE) terubahsuai dengan zarah nano emas (AuNPs) sebagai transduser yang dipegunkan bersama mikrosfera poli (n-butylakrilat-N-akriloksisuksinimida) dan jujukan DNA prob terikat melalui ikatan kovalen. Kompleks interkalator rutenium (II), $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{PIP}]^{2+}$ dan bpy = bipyridina, PIP = 2-fenilimidazo[4,5-f][1,10-fenantrolina] digunakan dalam pengesanan DNA porsin. Pengukuran dan pengoptimuman biosensor telah dilakukan dengan menggunakan voltammetrik siklik (CV) dan voltammetrik denyutan pembezaan (DPV). Interaksi antara $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{PIP}]^{2+}$ dengan beberapa jenis jujukan DNA telah dikaji iaitu, i) beban tunggal DNA prob, ii) selepas penghibridan DNA sasaran dan iii) selepas penghibridan dengan DNA bukan sasaran **telah dikaji**. Keputusan menunjukkan bahawa interaksi antara $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{PIP}]^{2+}$ dengan DNA sasaran yang telah terhibrid memberikan rangsangan yang paling tinggi. Prestasi biosensor adalah dipengaruhi oleh beberapa faktor antaranya ialah kepekatan $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{PIP}]^{2+}$ dan DNA prob, masa pemegungan dan penghibridan DNA prob, pH, kekuatan ion, kepekatan larutan penimbal dan suhu juga dikaji untuk menilai prestasi biosensor. Hasil kajian menunjukkan kepekatan kompleks $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{PIP}]^{2+}$ dan DNA prob, masing-masing adalah 50 μM dan 2 μM . Masa yang optimum bagi pemegungan DNA prob dan penghibridan DNA sasaran adalah 7 jam dan 60 minit. Keadaan optimum bagi pH, kekuatan ion, kepekatan larutan penimbal dan suhu, masing-masing adalah pH 7.0, 1.0 M NaCl, 0.05 M potassium fosfat pada suhu 25°C. Julat linear bagi kepekatan DNA sasaran yang berbeza adalah antara 1.0×10^{-13} M to 1.0×10^{-8} M. Kajian ini adalah yang pertama melaporkan tentang penggunaan $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{PIP}]^{2+}$ bagi pengesanan DNA porsin

Kata kunci: biosensor, DNA porsin, kompleks rutenium bipyridina

Abstract

Electrochemical DNA biosensor for detection of porcine oligonucleotides based on ruthenium (II) as label redox complex has been developed. The system of biosensor is based on the modified screen printed carbon electrode (SPE) with goldnanoparticles (AuNPs) as transducer immobilized with poly(n-butylacrylate-N-acryloxysuccinimide) microsphere and porcine DNA probe sequences was attached onto it via the covalent bond. The ruthenium(II) complex, $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{PIP}]^{2+}$ PIP = 2-phenylimidazo[4,5-f][1,10-phenanthroline] intercalator has been used to determine porcine DNA. The biosensor was measured and optimized by cyclic voltammetry (CV) and differential pulse voltammetry (DPV). The interaction of $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{PIP}]^{2+}$ with various DNA with different sequences, i) single stranded probe DNA, ii) after hybridization with its complementary DNA and iii) after hybridization with mismatch complementary DNA were studied. The results **indicate** that the interaction of $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{PIP}]^{2+}$ with hybridized complementary DNA gave the highest response. Thus, development of porcine DNA biosensor and influences of many factors such as $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{PIP}]^{2+}$ complex and DNA probe concentration, DNA probe immobilization and hybridization

time, pH, ionic strength, buffer concentration and temperatures were also studied to evaluate the performance of biosensor. The concentration of $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{PIP}]^{2+}$ complex and DNA probe were found to be optimal at 50 μM and 2 μM , respectively. The optimal time for DNA probe immobilization and hybridization were 7 hours and 60 minutes, accordingly. The optimal condition of pH, ionic strength, buffer concentration and temperatures were at pH 7.0, 1.0 M NaCl, 0.05 M of Na-phosphate buffer and 25 $^{\circ}\text{C}$, respectively. The linear range of different concentration complementary DNA was within the range between 1.0×10^{-13} M to 1.0×10^{-8} M. This study was first reported the used of $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{PIP}]^{2+}$ for detection of porcine oligonucleotides

Keywords: biosensor, porcine DNA, ruthenium bypyridine complex

Pengenalan

Asid deoksiribonukleik (DNA) merupakan suatu bahan biomolekul yang penting dalam organisma sebagai asas kepada ekspresi gen [1]. DNA membawa maklumat genetik organisma dan maklumat yang wujud dalam DNA adalah lebih banyak daripada protein disebabkan oleh kemerosotan kod genetik yang berlaku apabila DNA mengalami perubahan bentuk daripada DNA kepada protein [2]. Pada masa kini, pengesanan DNA adalah satu bidang yang menarik minat penyelidik kerana aplikasinya yang meluas dalam bidang klinikal, forensik, farmaseutikal dan pemprosesan makanan [3]. Selain daripada itu, penggunaan DNA dalam bidang biosensor mempunyai pelbagai manfaat seperti kebolehannya dalam pengesanan molekul secara semulajadi [4]. Pengesanan urutan-urutan spesifik dalam asid nukleik dengan menggunakan kaedah biosensor ini dapat mengatasi masalah penyediaan sampel yang rumit, kaedah analisis yang memakan masa yang lama, penggunaan bahan kimia yang berbahaya dan instrumentasi yang mahal [5].

Biosensor DNA secara elektrokimia memberikan hasil yang menarik kerana teknik elektrokimia mempunyai kelebihan mengatasi alat yang sedia ada. Kebiasaannya, teknik elektrokimia yang digunakan oleh penyelidik ialah transduksi voltammetri siklik (CV) dan voltammetri pembezaan denyutan (DPV) sebagai alat menganalisis interaksi larutan penunjuk redoks dengan DNA. Teknik elektrokimia ini juga ringkas dan mempunyai kos yang rendah [6]. Kaedah pengesanan penghibridan DNA berdasarkan kepada penggunaan penunjuk redoks menawarkan cara yang lebih menarik dan digemari para penyelidik berbanding pengesanan secara label bebas. Maka, pembangunan penunjuk elektrokimia yang lebih peka adalah penting untuk digunakan dalam biosensor DNA [3]. Kompleks logam polipiridil seperti ruthenium(II), rhodium(II), kuprum(II) dan sebagainya sering digunakan di dalam interaksi DNA bagi menghasilkan prob DNA elektrokimia, pemecahan kimia dan reagen biomedikal. Kini, kompleks ruthenium(II) pula telah digunakan secara meluas dalam kajian pengikatan DNA disebabkan oleh kestabilannya dari segi kimia, elektrokimia, geometri dan enantiomer serta kepekaan sifat – sifat fotofizikalnya kepada interaksi pengikatan dengan DNA [7]. Hal ini dilaporkan dengan kajian literatur yang dilakukan oleh Arockiasamy et al. [8] bahawa keupayaan kompleks logam polipiridil seperti ruthenium(II) mempunyai sifat pengikatan yang baik sebagai interkalator pada DNA.

Penggunaan kaedah – kaedah konvensional bagi pengesanan DNA seperti tindak balas rantai pempolimeran (PCR) dan southern blot mempunyai kekurangan seperti penyediaan sampel yang rumit, prosedur analisis yang banyak dan memakan masa yang lama serta instrumentasi mahal. Oleh kerana itu, kaedah biosensor DNA yang lebih praktikal ini mampu mengatasi masalah yang dihadapi pada kaedah-kaedah konvensional. Pembangunan biosensor DNA menghasilkan alat yang kecil, mudah alih, berkos rendah dan mudah dikendalikan [9].

Bahan dan Kaedah

Bahan kimia

Bahan kimia yang digunakan di dalam eksperimen ini seperti 1, 10 –fenontralina, ruthenium (III) klorida, 2, 2-bipiridina, benzaldehid, DNA sintetik porsin, DNA sasaran, DNA sintetik bos Taurus, DNA sintetik gallus didapati daripada Sigma Aldrich. kepekatan asid sulfurik 30% dan kepekatan asid nitric 10% dibeli daripada Sigma Aldrich dan garam natrium klorida dan garam natrium hidroksida daripada Fluka. Air nyahion yang digunakan diperolehi daripada alat penyahion (Milipore).

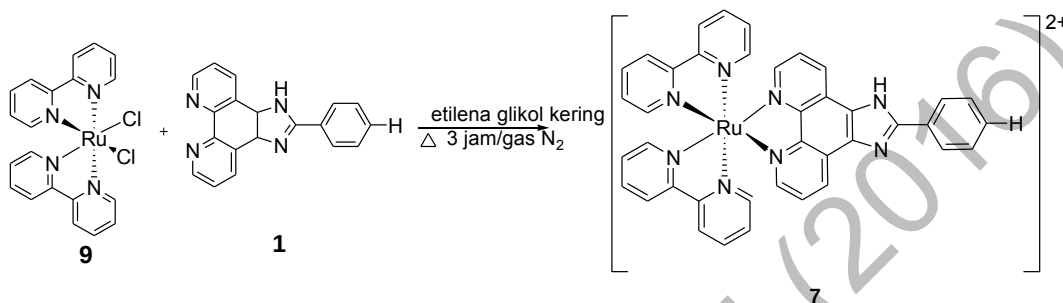
Pengukuran fizikal

Spektrum NMR (^1H and ^{13}C NMR) bagi kompleks ruthenium direkod menggunakan Bruker /AVANCE III 600 MHz Fourier 600 MHz. Spektrum Inframerah direkodkan menggunakan dis KBr (FTIR Perkin-Elmer GX Model).

Alat potentiostat Autolab dilengkapi dengan peranti *General Purpose Electrochemical System (GPES)* digunakan untuk pengukuran keupayaan biosensor.

Sintesis dan pencirian kompleks $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{PIP}]^{2+}$

Kompleks logam polipiridil $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{PIP}]^{2+}$ adalah tindak balas antara rutenium bipiridina diklorida dengan ligan pembantu, PIP, 2-fenilimidazo[4,5-f][1,10-fenantrolina] seperti yang dilaporkan oleh Li et al [10]. Gambarajah umum penyediaan kompleks ini ditunjukkan pada Rajah 1.1 di bawah.



Rajah 1. Sintesis penghasilan kompleks $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{PIP}]^{2+}$

Penyediaan elektrod bercetak skrin (SPE) terubah suai

Pemegunan zarah nano emas (AuNPs) dan mikrosfera poli(n-butilakrilat-N-akriloksisuksimida)

Elektrod karbon bercetak skrin (SPE) diubahsuai dengan pemendapan 0.1 mg zarah nano emas (AuNPs) dan 0.1 mg mikrosfera poli(n-butilakrilat-N-akriloksisuksimida) ke atas SPE. 0.1 mg zarah nano emas (AuNPs) yang telah dilarutkan methanol itu dikeringkan selama 20 minit. Mikrosfera akrilik yang digunakan di dalam kajian ini adalah seperti yang dilakukan oleh Ulianas et al [11].

Pencirian larutan $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{PIP}]^{2+}$

Kajian voltammetri siklik (CV) terhadap larutan $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{PIP}]^{2+}$

Elektrolit yang digunakan ialah 0.05 M larutan penimbal K-fosfat pH 7.0. Kajian voltammetri siklik bagi larutan penunjuk redoks $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{PIP}]^{2+}$ pada kepekatan 30 μM dijalankan dengan menggunakan kadar imbasan 100 mV/s. Kitaran voltammetrik siklik diimbis pada julat keupayaan 0.85 V hingga 1.2 V. Kajian voltammetri siklik dijalankan dalam keadaan statik.

Pencirian interaksi antara $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{PIP}]^{2+}$ dengan DNA porsin terpegun

Kesan kepekatan DNA prob

Kesan kepekatan DNA prob dikaji dengan memegunkan pelbagai kepekatan DNA prob (1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0 μM) ke atas SPE yang telah terubah suai dengan AuNPs dan mikrosfera akrilik. SPE terubah suai direndamkan di dalam larutan yang mengandungi prob DNA dan 0.05 M larutan penimbal K-fosfat pH 7.0.

Kesan masa pemegunan dan penghibridan DNA

Kajian kesan masa pemegunan DNA prob dilakukan pada sela masa 1 jam sehingga 24 jam manakala kajian terhadap masa penghibridan DNA sasaran dilakukan dengan pelbagai masa penghibridan antara 0.5 hingga 3.0 jam. Pemegunan 5.0 μM DNA prob dilakukan dalam larutan penimbal K-fosfat 0.05M (pH 7.0) manakala penghibridan dengan 2.0 μM DNA sasaran di dalam 0.05 M penimbal Na-fosfat (pH 7.0) yang juga mengandungi 30 μM larutan penunjuk redoks $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{PIP}]^{2+}$ dan kekuatan ion Na^+ 1.5 M.

Kesan pH dan kepekatan penimbal terhadap penghibridan DNA

Kajian kesan pH dilakukan dengan menyediakan larutan DNA sasaran 2.0 μM dalam larutan penimbal Na-fosfat 0.05 M pada pH yang berbeza (6.0 hingga 8.0). Kesan kepekatan penimbal pula dilakukan dengan menyediakan 2.0

μM larutan DNA sasaran dalam penimbal Na-fosfat pada pH 7.0 dengan kepekatan penimbal yang berlainan (0.02 M hingga 0.25 M). Proses penghibridan DNA sasaran dilakukan dengan kehadiran $30 \mu\text{M}$ $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{PIP}]^{2+}$ dan 1.5 M Na^+ ion.

Kesan kekuatan ion terhadap penghibridan DNA

Kesan kekuatan ion dikaji dengan menyediakan larutan $2.0 \mu\text{M}$ DNA sasaran dalam penimbal Na-fosfat 0.05 M (pH 7.0) yang mengandungi $30 \mu\text{M}$ $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{PIP}]^{2+}$ dan kekuatan ion yang berbeza iaitu 0.05 M hingga 2.0 M .

Kebolehasilan biosensor DNA

Kajian kebolehasilan terhadap interaksi $30 \mu\text{M}$ $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{PIP}]^{2+}$ dengan DNA sasaran ditentukan dengan melakukan pengukuran arus puncak secara berturutan dengan menggunakan lima SPE yang sama keadaan. SPE yang telah berubah suai itu mengandungi kuantiti AuNPs, mikrosfera akrilik, kepekatan prob dan DNA sasaran, masa pemegungan dan penghibridan DNA serta kepekatan larutan penimbal fosfat dan kekuatan ion Na^+ .

Keselektifan biosensor DNA pada DNA sasaran

Kajian keselektifan biosensor DNA sasaran porsin diuji dengan menggunakan jenis – jenis DNA sasaran yang berbeza iaitu DNA gallus (ayam), DNA bos taurus (daging lembu) dan DNA bukan sasaran porsin manakala DNA prob porsin dijadikan sebagai pengosong.

Julat rangsangan linear

Pelbagai kepekatan DNA sasaran daripada $1.0 \times 10^{-13} \mu\text{M}$ sehingga $1.0 \times 10^{-5} \mu\text{M}$ telah digunakan bagi menentukan julat rangsangan linear.

Keputusan dan Perbincangan

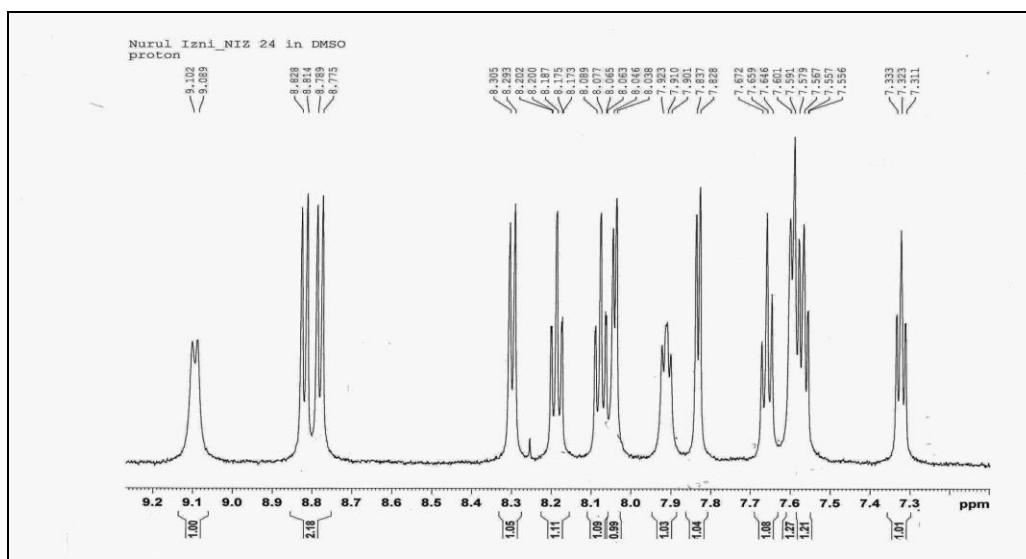
Sintesis dan pencirian kompleks ruthenium (II), $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{PIP}]^{2+}$

Analisis spektroskopi inframerah bagi kompleks $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{PIP}]^{2+}$ dilakukan bagi mengenal pasti kumpulan berfungsi yang terdapat pada kompleks ruthenium (II) ini. Data NMR (^1H dan ^{13}C) adalah bersamaan dengan data yang didapati pada kajian literatur. Spektroskopi infra merah menunjukkan kewujudan ligan 2-fenilimidazo[4,5-f][1,10-fenantrolina] dalam kompleks $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{PIP}]^{2+}$. Di dalam spektrum ini, terdapat jalur penyerapan pada 3369.77 cm^{-1} yang berpunca daripada regangan N-H pada kumpulan imidazol dalam ligan. Ciri – ciri gelang 2,2-bipiridina dalam kompleks logam $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{PIP}]^{2+}$, iaitu regangan $\text{N}=\text{C}$ aromatik, regangan $\text{C}=\text{C}$ aromatik, getaran $\text{C}-\text{N}$ aromatik dan bengkokkan $=\text{C}-\text{H}$ (luar satah) juga dapat dikesan masing-masing pada 2373.61 cm^{-1} , 1604 cm^{-1} , 1314.5 cm^{-1} dan 763.1 cm^{-1} .

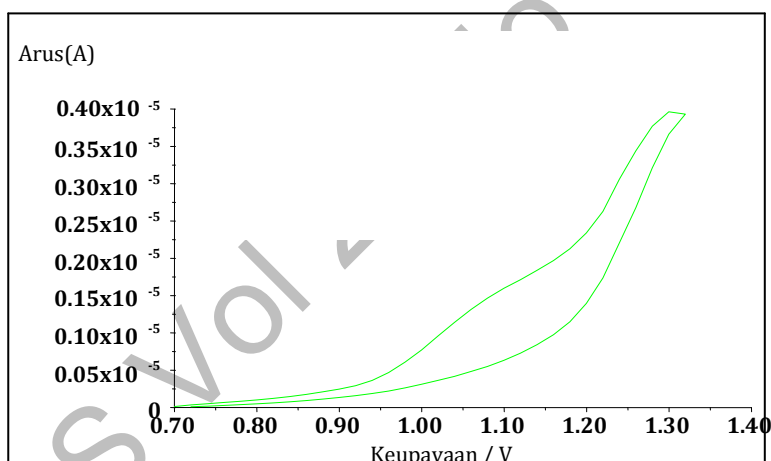
Pencirian kompleks $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{PIP}]^{2+}$ dengan menggunakan kaedah spektroskopi resonans magnet nukleus (RMN) ^1H dan ^{13}C (Rajah 2) dilakukan dengan melarutkan sampel dalam pelarut dimetilsulfoksida terdeuterat. Anjakan kimia bagi pelarut dimetilsulfoksida terdeuterat dapat dilihat pada spektrum RMN ^1H masing-masing pada 2.50 dan 3.50 ppm. Spektrum RMN ^1H menunjukkan terdapat lapan isyarat proton yang dapat dikesan pada julat 7.32 – 8.00 ppm. Isyarat dalam julat 7.32 hingga 8.00 ppm adalah dikenalpasti daripada proton-proton yang terdapat pada gelang benzena, 1,10-fenantrolina dan 2,2-bipiridina dalam kompleks $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{PIP}]^{2+}$.

Sifat voltammetri siklik larutan penunjuk redoks, $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{PIP}]^{2+}$

Rajah 3 menunjukkan voltammetrik siklik bagi 1 mM $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{PIP}]^{2+}$ dalam larutan penimbal K-fosfat pada pH 7.0 menggunakan SPE yang tidak diubahsuai. Keupayaan puncak anodik (E_{pa}) dan keupayaan puncak katodik (E_{pc}) dapat dilihat pada voltammogram siklik masing-masing pada 1.0 V dan 1.1 V dan nilai ini adalah menyamai keupayaan yang dilaporkan dalam kajian – kajian lepas oleh Erdem et al. [12] dan Johnston et al. [13].



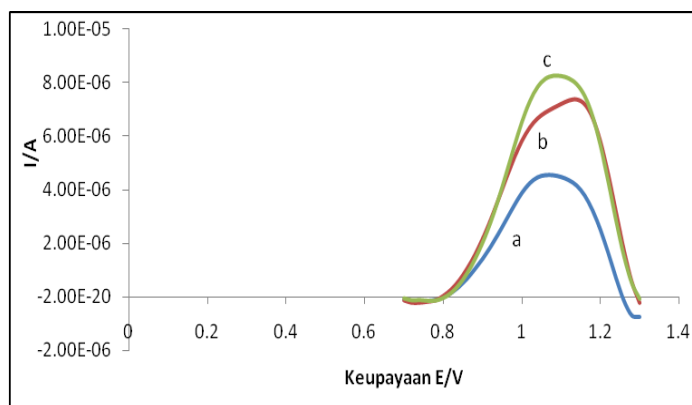
Rajah 2. Data spektroskopi RMN ^1H bagi kompleks ruthenium $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{PIP}]^{2+}$



Rajah 3. Voltammogram siklik bagi 1.0 mM $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{PIP}]^{2+}$ pada kadar imbasan 50 mV/s dalam larutan penimbil 0.05 M K-fosfat, elektrod rujukan Ag/AgCl, 3M KCl

Kajian voltammetri pembezaan denyutan (DPV) bagi $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{PIP}]^{2+}$ dengan DNA

Disebabkan oleh isyarat yang kurang jelas ditunjukkan daripada voltammogram siklik di atas, kajian interaksi antara kompleks ruthenium(II) ini dengan pelbagai DNA dikaji dengan menggunakan voltammetri pembezaan denyutan (DPV) kerana DPV lebih sensitif dan peka berbanding CV. Rajah 4 menunjukkan interaksi antara $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{PIP}]^{2+}$ dengan a) prob DNA porsin sahaja, b) DNA bukan sasaran selepas penghibridan dan c) DNA sasaran porsin selepas penghibridan. Daripada hasil kajian interaksi di atas, terdapat peningkatan arus DPV apabila kompleks $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{PIP}]^{2+}$ berinteraksi dengan baik secara interkalasi dengan DNA prob yang mengalami penghibridan dengan DNA sasarannya. Ini menyokong dapatan kajian yang telah dilakukan pada kajian sebelum ini oleh Xiong and Ji [14] di mana melaporkan bahawa kebanyakan kompleks logam polipiridil ruthenium(II) berinteraksi dengan DNA secara interkalasi.



Rajah 4. Voltammogram pembezaan denyutan (DPV) bagi interaksi antara $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{PIP}]^{2+}$ dengan a) prob DNA sahaja (bebenang tunggal), b) DNA bukan sasaran selepas penghibridan dan c) DNA sasaran selepas penghibridan

Pembangunan biosensor DNA porsin berdasarkan elektrod bercetak skrin (SPE) terubahsuai zarah nano emas (AuNPs), mikrosfera akrilik dan interkalator, $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{PIP}]^{2+}$

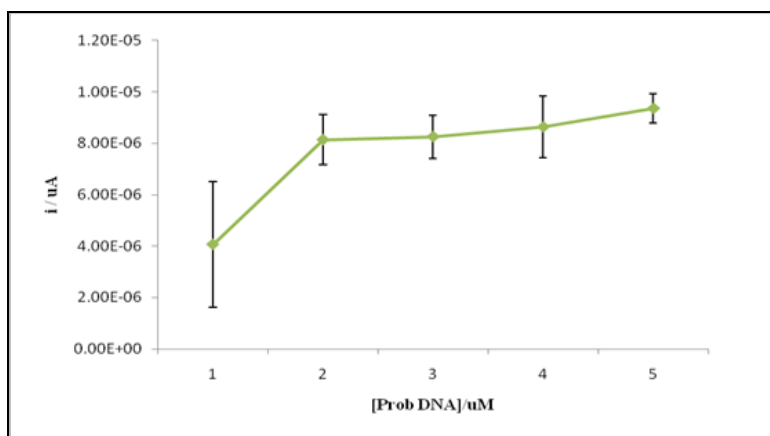
Kaedah bagi penyediaan SPE terubahsuai AuNPs-mikrosfera akrilik ini adalah seperti yang telah dijelaskan pada bahagian bahan dan kaedah. Kehadiran kumpulan berfungsi NH pada DNA adalah bagi membentuk ikatan kovalen kepada mikrosfera akrilik suksinimida yang digunakan. Ini membuatkan mikrosfera akrilik itu seolah-olah memegang DNA prob dalam keadaan tegak, memudahkan proses penghibridan DNA sasaran dan interkalator menyelit ke dalam pasangan-pasangan bes DNA. Rangsangan biosensor DNA porsin diuji dengan voltammetrik siklik (CV) dan voltammetrik pembezaan denyutan (DPV) pada keupayaan 0.85 V sehingga 1.10 V di dalam larutan penimbal K-fosfat pada pH dan kepekatan tertentu.

Kesan kepekatan prob DNA porsin

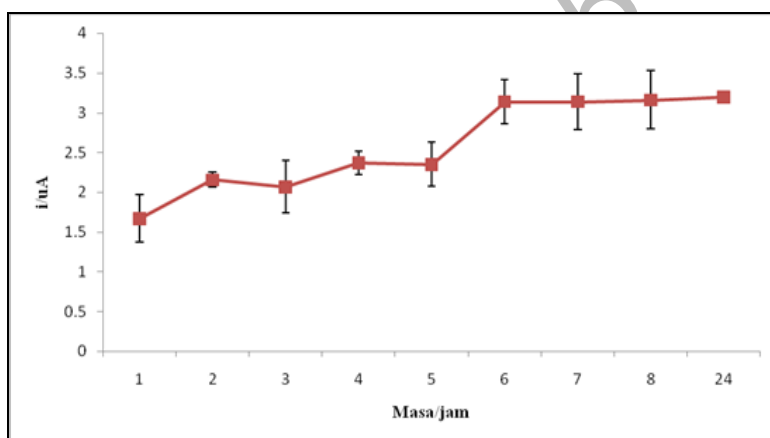
Rajah 5 menunjukkan kesan kepekatan prob DNA yang terpegun pada SPE yang terubahsuai dengan 0.025 mg zarah nanoemas (AuNPs) dan 0.1 mg mikrosfera akrilik terhadap rangsangan biosensor DNA porsin. Rangsangan DPV bagi interkalator $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{PIP}]^{2+}$ meningkat pada kepekatan prob DNA 1.0 μM sehingga 2.0 μM , kemudian selepas itu tiada perubahan ketara pada rangsangan yang dihasilkan sehingga kepekatan prob DNA 5 μM . Peningkatan rangsangan ini adalah disebabkan oleh peningkatan kepekatan prob DNA yang terpegun di atas SPE kerana semakin tinggi kepekatan prob DNA yang digunakan, semakin tinggi peluang prob DNA terpegun di atas SPE. Peningkatan kuantiti prob DNA yang terpegun pada bahan penyokong jika kepekatan prob DNA ditingkatkan adalah sama seperti yang dilaporkan oleh kajian – kajian lepas [15] yang menggunakan elektrod karbon berkaca (GCE) dan [16] elektrod emas terubahsuai sebagai tapak pemegungan prob DNA. Hasil kajian ini mendapati bahawa kepekatan prob DNA porsin yang optimum ialah 2.0 μM .

Kesan masa pemegungan prob DNA porsin

Dalam tindak balas kimia, masa tindak balas memberi kesan terhadap kuantiti hasil tindak balas. Oleh itu, kajian kesan masa pemegungan dan penghibridan perlu dijalankan seperti yang pernah dilaporkan oleh Ping et al [17]. Ini bertujuan untuk menentukan masa optimum pemegungan prob DNA dan penghibridan DNA sasaran. Rajah 6 menunjukkan kesan masa pemegungan 2.0 μM prob DNA porsin terhadap SPE terubahsuai.



Rajah 5. Kesan kepekatan prob DNA terhadap rangsangan biosensor DNA. Penghibridan dilakukan dalam larutan penimbal Na-fosfat 0.05 M pada pH 7.0 yang mengandungi 1 M NaCl dan $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{PIP}]^{2+}$



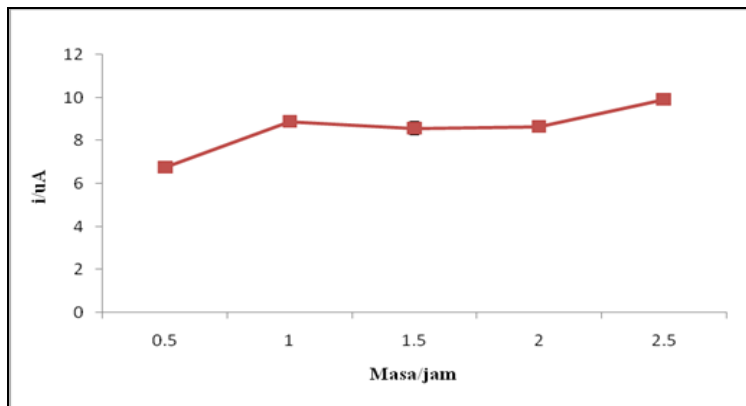
Rajah 6. Kesan masa pemegunan 2 μM prob DNA porsin ke atas SPE-AuNPs-mikrosfera terhadap rangsangan biosensor. Pemegunan dilakukan dalam 0.05 M penimbal K-fosfat pH 7.0 manakala penghibridan pula dilakukan dalam penimbal Na-fosfat 0.05 M pH 7.0 yang mengandungi 1.0 M NaCl dan 30 μM $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{PIP}]^{2+}$

Peningkatan rangsangan DPV interkalator $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{PIP}]^{2+}$ direkodkan berlaku pada 1 jam sehingga 6 jam prob DNA dipegunkan ke atas mikrosfera akrilik. Ini kerana berlakunya peningkatan kuantiti prob DNA yang terpegun ke atas SPE terubahsuai (SPE-AuNPs-mikrosfera). Selepas 6 jam, didapati tiada perubahan yang ketara pada arus DPV dan ia menjadi malar sehingga mencapai 24 jam. Ini menunjukkan bahawa semua tapak pemegunan mikrosfera akrilik (0.1 mg) telah terpegun dengan prob DNA (2 μM) pada masa pemegunan 6 jam. Oleh itu, tiada penambahan kuantiti prob DNA yang terpegun direkodkan selepas 6 jam sehingga jam ke 24. Hasil kajian mendapati masa yang optimum bagi pemegunan prob DNA pada permukaan mikrosfera akrilik adalah 6 jam.

Kesan masa penghibridan DNA sasaran porsin

Rajah 7 pula menunjukkan kesan masa penghibridan DNA terhadap rangsangan biosensor. Masa penghibridan DNA daripada 0.5 sehingga 1 jam telah meningkatkan penghibridan DNA, namun setelah masa penghibridan dipanjangkan sehingga 2.5 jam, rangsangan DPV $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{PIP}]^{2+}$ tidak menunjukkan peningkatan yang ketara. Ini

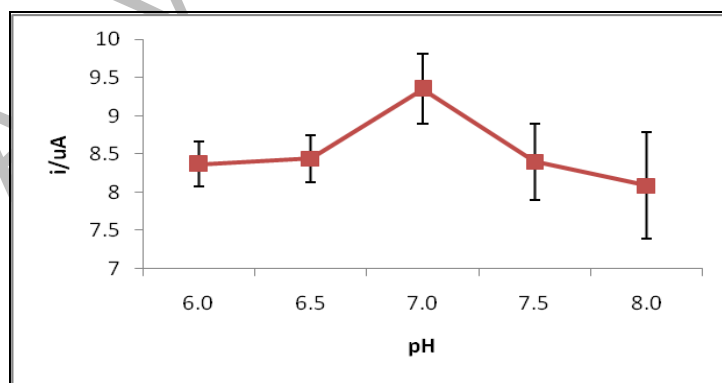
kerana pada 1 jam penghibridan semua prob DNA yang terpegun ke atas SPE-AuNPs-mikrosfera oleh DNA sasaran. Hasil kajian ini mendapati bahawa masa optimum bagi penghibridan DNA sasaran adalah optimum setelah 1 jam.



Rajah 7. Kesan masa penghibridan DNA sasaran porsin terhadap rangsangan biosensor. Penghibridan dilakukan dalam 0.05 M penimbal Na-fosfat pH 7.0 yang mengandungi 1.5 M NaCl dan $30 \mu\text{M}$ $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{PIP}]^{2+}$

Kesan pH dan kepekatan larutan penimbal terhadap penghibridan DNA

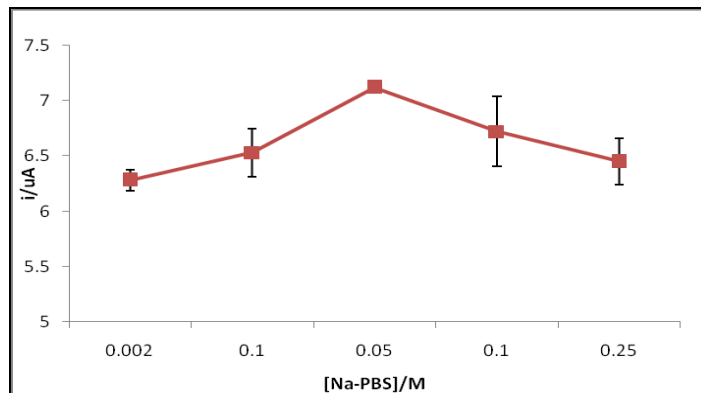
Rajah 8 menunjukkan kesan pH terhadap rangsangan biosensor DNA. Arus DPV $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{PIP}]^{2+}$ meningkat daripada pH 6.0 sehingga 7.0 dan kemudian menurun sehingga pH 8.0. Peningkatan rangsangan biosensor DNA ini menunjukkan bahawa penghibridan DNA sasaran semakin meningkat dengan peningkatan pH di dalam larutan. Sebaliknya penurunan rangsangan DPV $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{PIP}]^{2+}$ menunjukkan kuantiti penghibridan DNA semakin kurang pada julat 7.5 hingga 8.0. Ini menjelaskan bahawa kadar tindak balas penghibridan DNA boleh dipengaruhi oleh pH larutan seperti yang dilaporkan oleh kajian literatur [18]. Pada keadaan berasid berlaku tindak balas pemprotonan rantai fosfodiester DNA. Pemprotonan rantai fosfodiester akan menurunkan kelarutan molekul DNA [19]. Kelarutan yang menurun boleh mengganggu dan menurunkan kadar tindak balas penghibridan DNA.



Rajah 8. Kesan pH terhadap penghibridan DNA porsin. Penghibridan dilakukan dalam penimbal 0.05 M Na-fosfat yang mengandungi 1.5 M NaCl dan $30 \mu\text{M}$ $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{PIP}]^{2+}$

Rajah 9 pula adalah rangsangan biosensor DNA porsin dengan pelbagai kepekatan penimbal. Rangsangan DPV $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{PIP}]^{2+}$ meningkat daripada 0.002 M sehingga 0.05 M dan kemudian mulai merosot. peningkatan

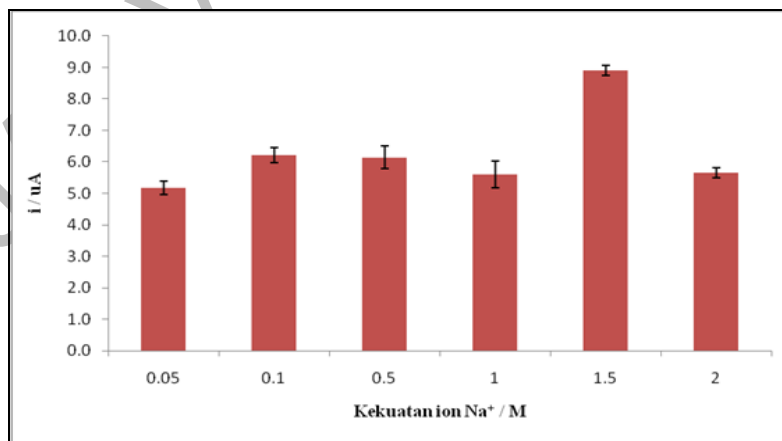
rangsangan DPV $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{PIP}]^{2+}$ menunjukkan berlakunya peningkatan kuantiti penghibridan DNA. Ini disebabkan oleh meningkatnya kuantiti ion Na^+ (kekuatan ion) jika kepekatan penimbal meningkat. Hasil kajian ini mendapati bahawa kepekatan penimbal Na-fosfat 0.05 M adalah optimum untuk penghibridan DNA porsin.



Rajah 9. Kesan kepekatan penimbal terhadap penghibridan DNA. Penghibridan dilakukan dalam pelbagai kepekatan penimbal Na-fosfat pH 7.0 yang mengandungi 1.5 M NaCl dan 30 μM $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{PIP}]^{2+}$

Kesan kekuatan ion terhadap penghibridan DNA sasaran porsin

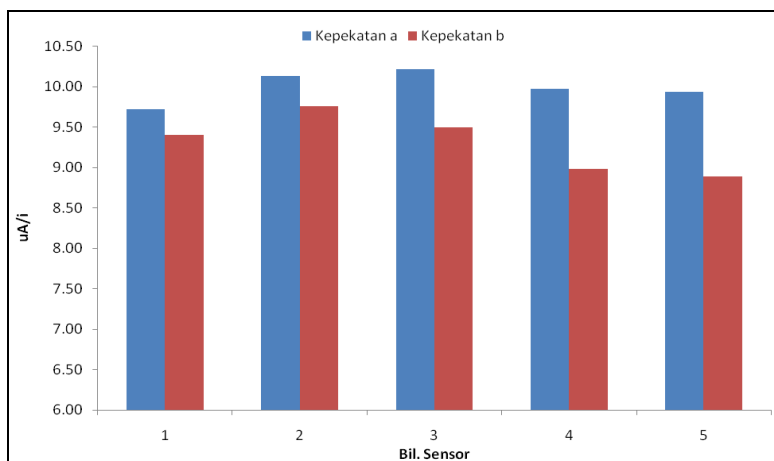
Kajian kesan kekuatan ion terhadap penghibridan DNA sasaran telah dilakukan dengan pelbagai kepekatan ion Na^+ daripada 0.05 M sehingga 2.0 M di dalam larutan penimbal Na-fosfat 0.05 M pada pH 7.0. Rajah 10 menunjukkan kesan kekuatan ion terhadap rangsangan biosensor. Rangsangan DPV $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{PIP}]^{2+}$ meningkat jika kekuatan ion meningkat dari 0.05 M hingga 1.5 M. Kekuatan ion berkesan menurunkan penolakan elektrostatik molekul DNA dan memberi kesan terhadap penghibridan DNA. Kadar tindak balas penghibridan meningkat dengan bertambahnya kepekatan garam. Kepekatan garam yang tinggi boleh menstabilkan bebenang dubel DNA (dsDNA) [20]. Kekuatan ion yang didapati daripada hasil kajian ini mencapai keadaan optimum pada 1.5 M ion Na^+ dalam larutan penimbal Na-fosfat 0.05 M dengan nilai pH 7.0.



Rajah 10. Kesan kekuatan ion Na^+ terhadap penghibridan DNA. Penghibridan dilakukan dalam penimbal 0.05 M Na-fosfat pada pH 7.0 yang mengandungi 30 μM $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{PIP}]^{2+}$

Kebolehasilan biosensor DNA porsin

Rajah 11 menunjukkan rangsangan DPV $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{PIP}]^{2+}$ untuk setiap kepekatan DNA sasaran. Ia menjelaskan tiada perbezaan yang ketara prestasi setiap biosensor dengan nilai RSD, masing-masing ialah 1.93 % dan 3.97 % ($n = 5$) bagi kepekatan 1×10^{-5} (a) dan 1×10^{-9} (b) μM . Nilai RSD yang diperolehi di dalam kajian ini adalah lebih rendah berbanding dengan kajian yang dilaporkan oleh kajian literatur seperti Erdem et al. [12] dan Wang et al. [21] iaitu masing-masing mencapai 10.13 % dan 10.12 %. Hal ini membuktikan bahawa interaksi antara kompleks logam $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{PIP}]^{2+}$ dengan DNA adalah lebih baik daripada kajian literatur yang menggunakan penunjuk redoks, $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ dan $[\text{Co}(\text{phen})_3]^{3+}$.



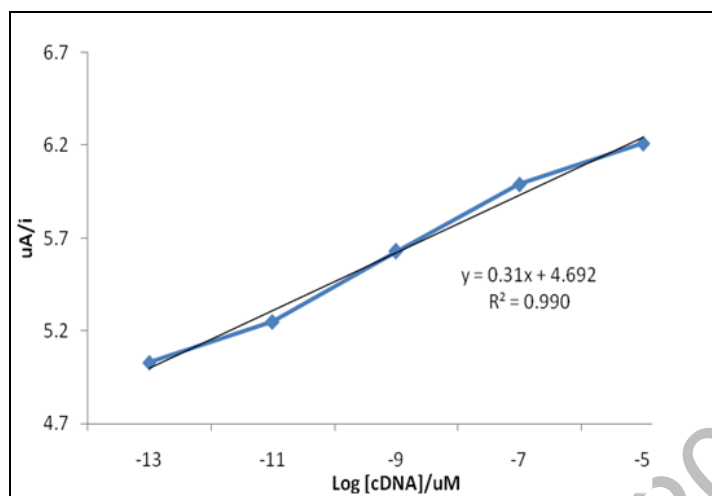
Rajah 11. Kebolehasilan biosensor DNA porsin dengan pelbagai kepekatan DNA sasaran dengan masa penghibridan selama 1 jam pada suhu bilik

Julat rangsangan linear bagi biosensor DNA porsin

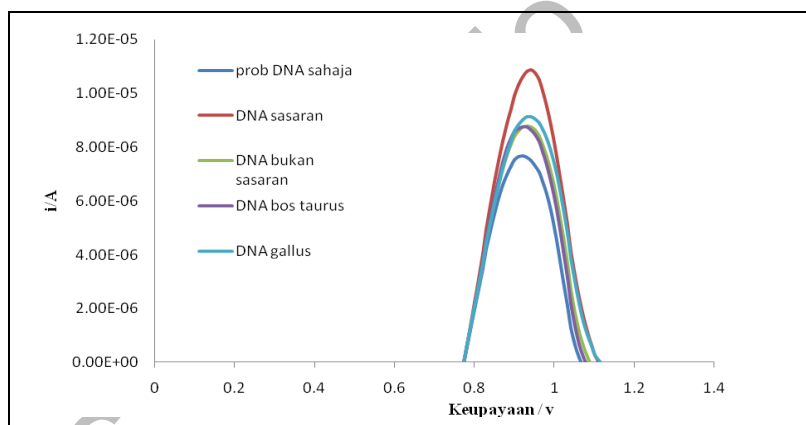
Hasil kajian mendapati rangsangan DPV $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{PIP}]^{2+}$ berkadar terus dengan kepekatan DNA sasaran pada julat kepekatan 1×10^{-13} sehingga 1×10^{-5} μM (Rajah 12). Menurut Kerman et al. [6] rangsangan biosensor DNA ini dengan menggunakan kompleks logam ini mempunyai had pengesanan yang baik. Hasil yang lebih baik ini adalah disebabkan oleh sifat hidrofobik dan peningkatan luas satah permukaan struktur 2,2-bipiridina dan 1,10-fenantrolina yang terdapat pada kompleks ruthenium ini. Ia meningkatkan sifat keafinan kompleks logam $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{PIP}]^{2+}$ berinteraksi dengan DNA.

Keselektifan biosensor DNA pada DNA sasaran

Rajah 13 menunjukkan rangsangan DPV bagi interaksi antara $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{PIP}]^{2+}$ dengan prob DNA porsin tanpa penghibridan, DNA bukan sasaran, DNA bos taurus (daging), DNA gallus (ayam) dan DNA sasaran porsin. Setiap satu DNA sasaran yang diuji mempunyai jujukan DNA yang berbeza. Hasil kajian menunjukkan bahawa rangsangan DPV yang paling tinggi terhasil daripada interaksi antara $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{PIP}]^{2+}$ tersebut dengan penghibridan DNA sasaran yang berpadanan dengan prob porsin itu. Manakala, didapati rangsangan DPV bagi penghibridan DNA prob dengan DNA bukan sasaran, DNA gallus (ayam) dan DNA bos taurus (daging) adalah lebih rendah daripada penghibridan dengan DNA sasaran (cDNA) dan interaksi kompleks $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{PIP}]^{2+}$ dengan prob DNA sahaja tanpa dihibrid menunjukkan rangsangan DPV yang paling rendah. Namun begitu, perbezaan rangsangan DPV antara penghibridan dengan DNA sasaran (cDNA) dengan DNA bukan sasaran yang lain tidak begitu ketara iaitu masing – masing, 10.9 uA (100%) dengan 8.74 uA hingga 9.12 uA (80 – 83.67 %). Hal ini menunjukkan biosensor DNA ini tidak dapat menghasilkan hasil keselektifan yang baik.



Rajah 12. Kesan pelbagai kepekatan DNA sasaran terhadap rangsangan biosensor DNA porsin. Penghibridan dilakukan dalam larutan penimbal K-fosfat 0.05 M pada pH 7.0 yang mengandungi 30 μ M larutan $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{PIP}]^{2+}$ dan 1.5 M NaCl.

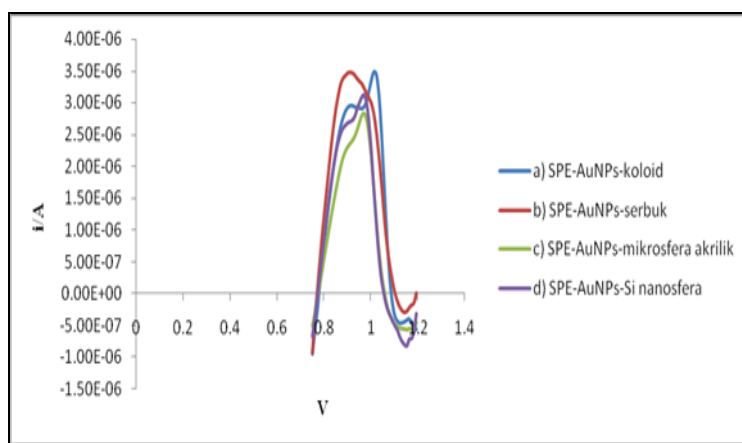


Rajah 13. Keselektifan biosensor DNA terhadap DNA sasaran porsin dan pelbagai jenis DNA tidak berpadanan. Penghibridan dilakukan dalam larutan penimbal K-fosfat 0.05 M pH 7.0 yang mengandungi 30 μ M $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{PIP}]^{2+}$ dan 1.5 M NaCl

Hal ini berlaku dijangkakan kerana berlaku deposit kompleks $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{PIP}]^{2+}$ ke dalam permukaan karbon elektrod skrin bercetak (SPE) semasa proses penghibridan prob DNA dengan DNA sasaran (cDNA). Apabila kompleks logam ruthenium tersebut telah diserap terlebih dahulu ke dalam permukaan elektrod, maka apabila penghibridan DNA berlaku atau tidak, ia tetap memberikan rangsangan pada arus DPV kerana redoks berlaku dengan kehadiran kompleks logam $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{PIP}]^{2+}$ iaitu dioksidakan kepada $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{PIP}]^{3+}$ dan diturunkan kembali kepada $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{PIP}]^{2+}$.

Justeru itu, kajian diteruskan dengan mengubahsuai permukaan elektrod iaitu daripada menggunakan mikrosfera akrilik suksinimida ditukar kepada menggunakan silika nanosfera (SiO_2). Signifikan pengubahsuaian ini adalah kerana SiO_2 yang mempunyai cas positif, di mana ia akan menolak tarikan dengan kompleks interkalator $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{PIP}]^{2+}$.

Rajah 14 menunjukkan rangsangan DPV bagi $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{PIP}]^{2+}$ pada elektrod yang terubahsuai yang berbeza-beza iaitu, a) SPE yang dipegunkan dengan 50 μL zarah nanoemas (AuNPs) koloid, b) SPE yang dipegunkan dengan 20 μL (1 mg/350 μL EtOH), c) SPE yang dipegunkan dengan mikrosfera akrilik 10 μL (1 mg/1000 μL EtOH) dan d) SPE yang dipegunkan dengan 2 μL (6 mg/500 μL EtOH). Ini bagi mengkaji punca sebenar deposit kompleks ruthenium (II) ke atas elektrod. Walau bagaimanapun, hasil kajian mendapati tiada perbezaan signifikan terhadap rangsangan DPV $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{PIP}]^{2+}$ pada SPE yang terubahsuai. Justeru itu, ia dapat disimpulkan bahawa penggunaan SiO_2 juga tidak dapat menyelesaikan masalah ini. Maka, kajian lanjutan perlu dilakukan bagi memastikan pembangunan biosensor DNA porsin ini mampu menghasilkan keselektifan yang tinggi. Kajian masa hadapan yang boleh dilakukan adalah dengan memberi tumpuan kepada fabrikasi biosensor sendiri. Kajian lanjutan menggunakan beberapa elektrod juga adalah wajar. Walaubagaimanapun, hasil kajian ini telah membuktikan bahawa penggunaan ruthenium kompleks memberikan rangsangan yang tinggi dalam pengesanan DNA porsin.



Rajah 14. Rangsangan DPV bagi $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{PIP}]^{2+}$ pada SPE terubahsuai berlainan

Kesimpulan

Secara keseluruhannya, hasil kajian menunjukkan bahawa elektrod skrin bercetak (SPE) yang telah terubahsuai dengan menggunakan zarah nanoemas dan mikrosfera akrilik yang dihubungkan dengan voltammetri pembezaan denyutan (DPV) adalah sesuai untuk mengesan DNA porsin pada kepekatan rendah. Kaedah ini adalah mudah, kebolehpercayaannya tinggi dan memerlukan penggunaan sampel yang kecil. Kelebihan utama biosensor DNA ini adalah ia tidak memerlukan penggunaan bahan kimia beracun dan modifikasi asid nukleik. Selain itu, pengesanan DNA terpegun pada permukaan elektrod juga dapat dilakukan dengan cepat.

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 **DIP-2014-016**.

Rujukan

1. Zhai, J., Cui, H. and Yang, R. (1997). DNA based biosensors. *Biotechnology Advances*, 15(1): 43 – 58.
2. Wolf, C., Burgener, M., Hübner, P. and Lüthy, J. (2000). PCR-RFLP analysis of mitochondrial DNA: differentiation of fish species. *LWT-Food Science and Technology*, 33(2): 144 – 150.
3. Zhang, S., Tan, Q., Li, F. and Zhang, X. (2007). Hybridization biosensor using diaquabis [N-(2-pyridinylmethyl) benzamide- κ 2 N, O]-cadmium (II) dinitrate as a new electroactive indicator for detection of human hepatitis B virus DNA. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 124(2): 290 – 296.

4. Ferancová, A., Bucková, M., Korgová, E., Korbut, O., Gründler, P., Wärmann, I., Štěpán, R., Barek, J., Zima, J. and Labuda, J. (2005). Association interaction and voltammetric determination of 1-aminopyrene and 1-hydroxypyrene at cyclodextrin and DNA based electrochemical sensors. *Bioelectrochemistry*, 67(2): 191 – 197.
5. Erdem, A., Kerman, K., Meric, B., Akarca, U. S. and Ozsoz, M. (2000). Novel hybridization indicator methylene blue for the electrochemical detection of short DNA sequences related to the hepatitis B virus. *Analytica Chimica Acta*, 422(2): 139 – 149.
6. Kerman, K., Ozkan, D., Kara, P., Meric, B., Gooding, J. J. and Ozsoz, M. (2002). Voltammetric determination of DNA hybridization using methylene blue and self-assembled alkanethiol monolayer on gold electrodes. *Analytica Chimica Acta*, 462(1): 39 – 47.
7. Richards, A. D. and A. Rodger (2007). Synthetic metallomolecules as agents for the control of DNA structure. *Chemical Society Reviews*, 36(3): 471 – 483.
8. Arockiasamy, L. D., Radhika, S., Parthasarathi, R. and Unni Nair, B (2009). Synthesis and DNA-binding studies of two ruthenium (II) complexes of an intercalating ligand. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 44(5): 2044 – 2051.
9. Ozsoz, M., Erdem, A., Kara, P., Kerman, K. and Ozkan, D. (2003). Electrochemical biosensor for the detection of interaction between arsenic trioxide and DNA based on guanine signal. *Electroanalysis*, 15 (7): 613 – 619.
10. Li, J., Xu, L.-C., Chen, J.-C., Zheng, K.-C. and Ji, L.-N. (2006). Density functional theory/time-dependent DFT studies on the structures, trend in DNA-binding affinities, and spectral properties of complexes [Ru (bpy) 2 (p-R-pip)] 2+(R=OH, CH3, H, NO2). *The Journal of Physical Chemistry A*, 110(26): 8174 – 8180.
11. Ulianas, A., Lee, Y. H., Hanifah, S. A. and Tan. L. L. (2012). An electrochemical DNA microbiosensor based on succinimide-modified acrylic microspheres. *Sensors*, 12(5): 5445 – 5460.
12. Erdem, A., Kerman, K., Meric, B., Ozkan, D., Kara, P. and Ozsoz, M. (2002). DNA biosensor for *Microcystis* spp. sequence detection by using methylene blue and ruthenium complex as electrochemical hybridization labels. *Turkish Journal of Chemistry*, 26(6): 851 – 862.
13. Johnston, D. H., Katherine, C. G. and Thorp, H. H. (1995). Electrochemical measurement of the solvent accessibility of nucleobases using electron transfer between DNA and metal complexes. *Journal of the American Chemical Society*, 117 (35): 8933 – 8938.
14. Xiong, Y. and Ji, L.-N. (1999). Synthesis, DNA-binding and DNA-mediated luminescence quenching of Ru (II) polypyridine complexes. *Coordination Chemistry Reviews*, 185: 711 – 733.
15. Alferdo, D. L. E. M., Maria, B. G. G and Agustin, C. G. (2007). DNA hybridization sensor based on aurothiomalate electroactive label on glassy carbon electrodes. *Biosensor and Bioelectronics*, 22: 1048 – 1054.
16. Loaiza, O. A., Campuzano, S., Pedrero, M. and Pingarron, J. M. (2007). DNA sensor based on an *Escherichia coli lac Z* gen prob immobilization at self-assembled monolayers-modified gold electrodes. *Talanta* 73: 838 – 844.
17. Ping, D., Hongzia, L. and Wei, C. (2009). Construction of DNA sandwich electrochemical biosensor with nano PbS and nanoAu tags on magnetic microbeads. *Biosensor and Bioelectronics*, 24: 3223 – 3228.
18. Hames, B. B. and Higgins, S. J (1985). Nucleic acid hybridisation-a practical approach. *Oxford University Press*.
19. Metznerberg, S (2007). Working with DNA. USA: Taylor & Francis. California State University Northridge.
20. Lucarelli, F., Marazza, G., Turner, A.P.F and Mascini, M. (2004). Carbon and gold electrodes as electrochemical transducers for DNA hybridization sensors. *Biosensors and Bioelectronics*, 19: 515 – 530
21. Wang, J. Cai, X., Rivas, G. and Shiraishi, H. (1996). Stripping potentiometric transduction of DNA hybridization process. *Analytica Chimica Acta*, 326: 141 – 147.