

## Biosensor Nitrit Optik Berasaskan Hemoglobin Terpegun pada Mikrosfera Poliakrilat (Optical Nitrite Biosensor based on Hemoglobin-Immobilized Polyacrylate Microspheres)

SYAMIMI HASLAN, LING LING TAN\*, LEE YOOK HENG & GOH CHOO TA

### ABSTRAK

*Biosensor optik berasaskan hemoglobin (Hb) terpegun pada mikrosfera poli(n-butyl akrilat-co-N-akriloksisuksinimida) [poli(nBA-NAS)] telah dibangunkan bagi mengesan kepekatan ion nitrit ( $\text{NO}_2^-$ ). Kompleks HEM ferum dalam Hb memungkinkan tindak balas penurunan ion  $\text{NO}_2^-$  kepada nitrik oksida (NO) lalu bergabung dengan deoksihemoglobin ( $\text{HbFe}^{2+}$ ) membentuk kompleks ferum-nitrosil-hemoglobin ( $\text{HbFe}^{2+}\text{-NO}$ ) yang berwarna hijau kekuningan. Spektrofotometer pantulan gentian optik digunakan untuk memantau kepekatan ion  $\text{NO}_2^-$  secara kuantitatif berdasarkan perubahan warna Hb terpegun pada mikrosfera poliakrilat daripada perang kemerahan ke hijau kekuningan pada panjang gelombang pantulan maksimum 668 nm. Pencirian terhadap biosensor nitrit reflektometrik melibatkan ujian kesan pH, kesan kepekatan Hb, julat rangsangan linear, kebolehasilan, jangka hayat dan kesan gangguan ion telah dijalankan. Biosensor ion  $\text{NO}_2^-$  optik terbangun memaparkan julat linear dinamik daripada 5 hingga 50  $\text{mg mL}^{-1}$  ( $R^2=0.9894$ ) pada pH7.0 dengan had pengesanan (LOD) sebanyak 3.3  $\text{mg mL}^{-1}$  dan nilai sisihan piawai relatif (RSD) kebolehasilan biosensor sebanyak 5.8%. Jangka hayat biosensor optik nitrit tersebut adalah selama 36 hari dan majoriti ion asing yang sering wujud bersama ion  $\text{NO}_2^-$  dalam sampel air semula jadi tidak menunjukkan kesan gangguan yang bererti terhadap penentuan ion  $\text{NO}_2^-$  menggunakan biosensor optik terbangun kecuali ion  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{Ag}^+$ ,  $\text{Br}$  dan  $\text{S}^{2-}$ .*

*Kata kunci: Biosensor; hemoglobin; mikrosfera akrilik; penentuan nitrit*

### ABSTRACT

*Optical biosensor based on hemoglobin (Hb) immobilized on the poly(n-butyl acrylate-co-N-acryloxysuccinimide) microspheres has been developed for the detection of nitrite ( $\text{NO}_2^-$ ) ion concentration. The iron HEM complex in the Hb catalyzed the reduction of  $\text{NO}_2^-$  ion to nitric oxide (NO) followed by binding with deoxyhemoglobin ( $\text{HbFe}^{2+}$ ) to form the yellowish green iron-nitrosyl-hemoglobin ( $\text{HbFe}^{2+}\text{-NO}$ ) complex. Fiber optic reflectance spectrophotometer was used to monitor the  $\text{NO}_2^-$  ion concentration quantitatively based on colour change of the immobilized Hb on the polyacrylate microspheres from reddish brown to yellowish green at the maximum reflectance wavelength of 668 nm. Characterization of the reflectometric nitrite biosensor encompassed pH effect, Hb concentration effect, linear response range, reproducibility, shelf life and ion interference effect studies had been conducted. The developed optical  $\text{NO}_2^-$  ion biosensor exhibited dynamic linear range from 5 to 50  $\text{mg mL}^{-1}$  ( $R^2=0.9894$ ) at pH7.0 with a limit of detection (LOD) of 3.3  $\text{mg mL}^{-1}$  and reproducibility relative standard deviation (RSD) value of the biosensor at 5.8%. The shelf life of the optical nitrite biosensor is about 36 day and majority foreign ions that are often co-exist with  $\text{NO}_2^-$  ion in the natural water sample did not show significant interference effect towards the determination of  $\text{NO}_2^-$  ion using the developed optical biosensor except  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{Ag}^+$ ,  $\text{Br}$  and  $\text{S}^{2-}$  ions.*

*Keywords: Acrylic microsphere; biosensor; hemoglobin; nitrite determination*

### PENGENALAN

Pertumbuhan penduduk dan teknologi yang pesat telah menyumbang kepada peningkatan kawasan perindustrian. Hal ini secara tidak langsung menghasilkan corak pertumbuhan yang tidak lestari dan menyebabkan kemusnahan sumber asas semula jadi. Pembangunan yang tidak terkawal turut mengakibatkan pencemaran air persekitaran yang serius. Peningkatan permintaan air bersih menyebabkan persaingan dalam kalangan pelbagai sektor pengguna air. Pertumbuhan ekonomi yang berterusan mengeruhkan lagi keadaan (Raja Dato' Zaharaton 2004). Pencemaran alam sekitar yang menjejaskan kesihatan

manusia serta pembangunan sosioekonomi menjadi keprihatinan global. Kehadiran bahan pencemar alam sekitar terutamanya bahan toksin kimia, menimbulkan kebimbangan kesihatan awam yang serius (Koedrith et al. 2015).

Nitrit hadir sebagai bahan pencemar dalam air minuman daripada air bawah tanah dan telaga. Terdapat banyak sumber nitrogen semula jadi mahupun antropogenik yang boleh menyebabkan air bawah tanah dicemari oleh nitrit. Peningkatan pencemaran air minuman kebiasaannya disebabkan oleh penggunaan baja dan pembuangan sampah komersial yang meluas (Ward et al. 2005). Bahan buangan

seperti tanah pertanian yang dibaja, air sisa industri, fidlot haiwan, tangki septik dan saluran bandar merupakan antara sumber antropogenik utama pencemaran nitrit air bawah tanah (Samaneh Khademikia et al. 2013). Nitrit juga digunakan dalam pemprosesan makanan, iaitu bertujuan untuk menaikkan warna dan menyebarkan aktiviti antimikrob bagi memelihara produk berasaskan daging (Butler 2014).

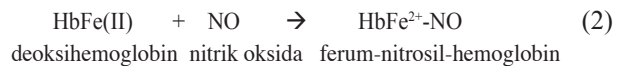
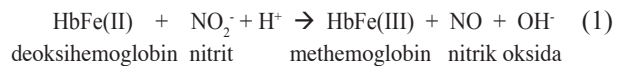
Ion nitrit ( $\text{NO}_2^-$ ) mengandungi nitrogen yang berada dalam keadaan pengoksidaan yang tidak stabil. Ia boleh bertindak balas dengan sebatian organik semula jadi atau sintetik yang dikenali sebagai amina sekunder atau amida dalam makanan atau air, lalu membentuk sebatian baru sama ada nitrosoamina atau nitrosoamida, yang merupakan sebatian karsinogen (Bryan et al. 2012). Methemoglobinemia, juga dikenali sebagai *blue baby syndrome* dilihat pada bayi yang diberi susu rumusan yang dibancuh dengan air tercemar nitrit. Methemoglobinemia merujuk kepada keadaan anemia yang disebabkan oleh pengoksidaan ion ferus oleh nitrit dalam hemoglobin ( $\text{HbFe}^{2+}$ ) kepada ion ferik secara tidak berbalik dan menyebabkan hemoglobin bertukar menjadi methemoglobin ( $\text{HbFe}^{3+}$ ). Hal ini boleh menyebabkan sianosis, hipokseミア tisu dan dalam kes yang lebih teruk boleh menyebabkan kematian (Quek et al. 2015). Bayi lebih cenderung kepada penyakit methemoglobinemia disebabkan oleh had ketinggian fizikal serta perkembangan saraf mereka yang masih di peringkat awal menghalang pengangkutan oksigen (Moorcroft et al. 2001).

Potensi ketoksikan nitrit menimbulkan kerisauan, maka rangka kerja teratur telah dihasilkan bertujuan untuk mengawal kadar nitrit dalam persekitaran, termasuklah dalam produk makanan. Beberapa kaedah analisis seperti spektrometri, pendarfluor, ujian *Griess*, kromatografi ion, kimipendarcahaya dan elektrokimia telah digunakan dalam penentuan nitrit terutamanya dalam sampel air. Walau bagaimanapun, teknik tersebut masing-masing mempunyai kelemahan tersendiri, kebanyakannya memakan masa, memerlukan tenaga kerja mahir dan peralatan yang mahal. Kaedah yang paling banyak digunakan dalam penentuan nitrit ialah kaedah spektroskopi kerana had pengesanan yang rendah dan protokol jenis asai yang mudah digunakan.

Biosensor memenuhi kriteria sebagai kaedah yang berkos rendah, peka, selektif, stabil dan memakan masa analisis yang pendek (Wen et al. 2014). Kelebihan utama biosensor berbanding dengan kaedah konvensional yang lain ialah keupayaannya untuk digunakan secara *in-situ*, mudah alih, menunjukkan potensi yang tinggi untuk pengecilan serta kebolehnya untuk mengesan bahan pencemar dalam matriks kompleks dengan perawatan sampel yang minima. Kini, biosensor telah digunakan oleh pelbagai industri dalam penyediaan maklumat yang mencukupi dalam asai rutin dan pemeriksaan sampel (Tereshchenko et al. 2016).

Dalam kajian ini, biosensor ion nitrit optik berasaskan hemoglobin (Hb) telah dibangunkan. Mikrosfera poli(*n*-butil akrilat-co-*N*-akriloksisuksinimida) [poli(*n*BA-NAS)] telah digunakan sebagai matriks pemegun Hb. Molekul

Hb dipegunkan ke atas mikrosfera kopolimer poli(*n*BA-NAS) melalui ikatan kovalen amida antara kumpulan berfungsi suksinimida pada mikrosfera akrilik dan kumpulan berfungsi amina pada Hb. Kumpulan HEM dalam rantai polipeptida Hb bertanggungjawab memangkinkan tindak balas penurunan nitrit ( $\text{NO}_2^-$ ) kepada nitrik oksida (NO), sementara Hb tersebut ( $\text{HbFe}^{2+}$ ) teroksidakan kepada methemoglobin ( $\text{HbFe}^{3+}$ ). Oleh kerana NO yang terhasil mempunyai keafinan yang tinggi terhadap kompleks HEM ferum dalam Hb, ia kemudian bergabung dengan deoksihemoglobin ( $\text{HbFe}^{2+}$ ) membentuk kompleks ferum-nitrosil-hemoglobin ( $\text{HbFe}^{2+}\text{-NO}$ ) berwarna hijau kekuningan yang boleh dipantau secara reflektometrik menggunakan spektrofotometer pantulan gentian optik. Persamaan (1) menunjukkan persamaan kimia bagi tindak balas penurunan ion nitrit oleh Hb terpegun pada mikrosfera kopolimer poli(*n*BA-NAS) dan Persamaan (2) mewakili tindak balas pembentukan kompleks hijau kekuningan ferum-nitrosil-hemoglobin antara deoksihemoglobin ( $\text{HbFe}^{2+}$ ) dan NO.



## BAHAN DAN KAEDAH

### BAHAN KIMIA

Bahan kimia yang digunakan dalam kajian ini adalah seperti serbuk beku-kering hemoglobin (Hb), natrium nitrit ( $\text{NaNO}_2$ ), *N*-akriloksisuksinimida (NAS) dan 1,6-heksanadiol diakrilat (HDDA) yang diperoleh daripada Sigma-Aldrich. Monomer *n*-butil akrilat (*n*BA) daripada BDH, natrium dodesil sulfat (SDS) daripada System dan 2,2-dimetoksi-2-fenilasetofenon (DMPP) dari Fluka. Kesemua bahan kimia yang digunakan dalam kajian ini adalah bergred analitik dan air ternyahion digunakan bagi setiap penyediaan larutan akueus dan pembersihan alat kaca. Larutan Hb disediakan dengan melarutkan serbuk beku-kering Hb dalam larutan penimbal kalium fosfat 0.1 M pada pH7.0. Larutan nitrit juga disediakan dengan menggunakan larutan penimbal yang sama dengan melarutkan natrium nitrit dalam kuantiti yang diperlukan. Larutan penimbal tersebut disediakan berdasarkan kaedah yang dirujuk daripada *Handbook of Chemistry and Physics* (Robert 1972).

### INSTRUMENTASI

Alat sonikasi (Elmasonic), pengempar (HERMLE Z230A, 5500 rpm) dan unit sinar ultra lembayung (UV, R.S. Ltd) digunakan semasa penghasilan mikrosfera poli(*n*BA-NAS). Unit pendedahan UV tersebut memancarkan cahaya UV (15 W) pada panjang gelombang 350 nm. Saiz dan morfologi mikrosfera akrilik diperhatikan menggunakan mikroskop

elektron imbasan (SEM, LEO 1450VP) pada voltan pecutan 3 kV dan pembesaran sebanyak 2 kX. Spektrofotometer ultra lembayung-nampak (Varian-Cary Win UV 50) digunakan dalam analisis kestabilan foto larutan Hb dan spektrofotometer pantulan gentian optik digunakan bagi mengukur rangsangan biosensor ion  $\text{NO}_2^-$ . Pengukuran pH dijalankan menggunakan meter pH (MeterLab PHM 210) yang dilengkapi dengan elektrod kaca.

#### PENYEDIAAN MIKROSFERA KOPOLIMER POLI(*n*BA-NAS)

Mikrosfera kopolimer poli(*n*BA-NAS) disediakan melalui kaedah fotopempolimeran dalam bentuk emulsi. Secara ringkasnya, mikrosfera akrilik tersebut disediakan dengan mencampurkan 7 mL monomer *n*BA, 0.01 g surfaktan SDS, 450  $\mu\text{L}$  agen taut silang HDDA, 10 mg monomer NAS, 0.10 g bahan pemula fotopempolimeran DMPP dan 15 mL air ternyahion ke dalam sebuah botol sintilasi. Campuran tersebut kemudiannya disonikasi pada suhu bilik (25°C) selama 10 min. Kemudian, emulsi berwarna putih susu yang terhasil dipindahkan ke piring petri dan didedahkan kepada cahaya UV bawah unit sinar UV selama 600 s dalam persekitaran gas nitrogen bagi membolehkan proses fotopempolimeran berlaku. Seterusnya, mikrosfera kopolimer yang terhasil dipindahkan ke dalam tiub pengempar 15 mL dan ditambahkan dengan larutan penimbal kalium fosfat 0.1 M (pH7.0). Mikrosfera diasingkan dengan alat pengempar pada kelajuan 6000 rpm selama 10 min. Sebanyak tiga kitaran basuh dilakukan dengan bilasan menggunakan larutan penimbal kalium fosfat 0.1 M (pH7.0) agar mikrosfera akrilik dapat diasingkan daripada bahan kimia berlebihan yang tidak bertindak balas dalam sintesis mikrosfera poli(*n*BA-NAS). Mikrosfera akrilik yang tersintesis kemudian dikeringkan pada suhu bilik selama dua hari.

#### FABRIKASI BIOSENSOR OPTIK NITRIT BERASASKAN HEMOGLOBIN TERPEGUN

Sebanyak 10 mg mikrosfera poli(*n*BA-NAS) ditimbang ke dalam penutup tiub mikro pengempar 500  $\mu\text{L}$ . Ia kemudian dimampatkan secara manual bagi mendapatkan permukaan yang rata. Kemudian, larutan Hb 50 mg  $\text{mL}^{-1}$  dipipetkan pada permukaan mikrosfera akrilik dan dibiarkan kering semalaman pada suhu 25°C bagi membolehkan ikatan kovalen terbentuk antara molekul Hb dan mikrosfera akrilik. Selepas itu, biosensor berasaskan hemoglobin tersebut dibilas menggunakan larutan penimbal kalium fosfat 0.1 M pada pH7.0 bagi mengasingkan Hb yang terjerap secara fizikal pada permukaan mikrosfera akrilik dan dibiarkan dalam keadaan kering suhu ambien normal.

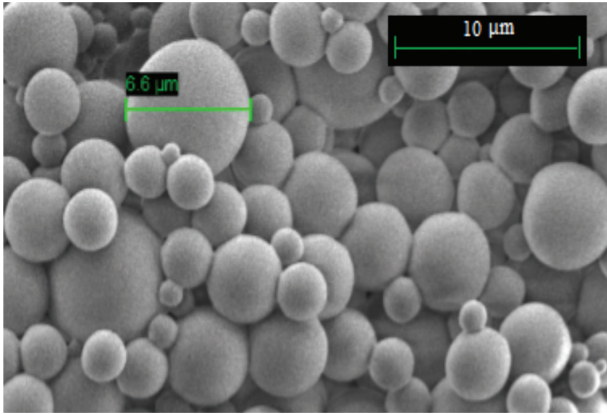
#### PENCIRIAN TINDAK BALAS ANTARA HEMOGLOBIN TERPEGUN DAN ION $\text{NO}_2^-$

Pencirian tindak balas antara Hb terpegun dan ion  $\text{NO}_2^-$  melibatkan ujian kesan pH, kesan kepekatan Hb, julat kepekatan dinamik, kebolehasilan, jangka hayat dan kesan gangguan ion telah dijalankan menggunakan

spektrofotometer pantulan gentian optik. Uji kaji kesan pH ke atas rangsangan optik biosensor nitrit dilakukan dengan mengubah pH larutan penimbal kalium fosfat 0.1 M yang disediakan daripada campuran kalium dihidrogen fosfat 0.1 M dan dikalium hidrogen fosfat 0.1 M sebagai pelarut kepada 60 mg  $\text{mL}^{-1}$  ion  $\text{NO}_2^-$ . Kajian kesan kepekatan Hb dijalankan dengan mempelbagaikan kepekatan larutan Hb yang digunakan dalam pemegunan pada mikrosfera kopolimer poli(*n*BA-NAS) daripada 1-220 mg  $\text{mL}^{-1}$  dalam larutan penimbal kalium fosfat 0.1 M. Julat linear dinamik biosensor reflektometrik nitrit ditentukan dengan menggunakan larutan ion  $\text{NO}_2^-$  berjulat daripada 5 hingga 80 mg  $\text{mL}^{-1}$  pada panjang gelombang patulan 668 nm. Peratusan sisihan piawai relatif (% RSD) kebolehasilan biosensor ditentukan dengan menggunakan tiga unit biosensor berasaskan poli(*n*BA-NAS) terpegun Hb dalam pengesanan kepekatan ion  $\text{NO}_2^-$  pada 20 dan 40 mg  $\text{mL}^{-1}$ . Sebelum pemegunan Hb dilakukan, ujian kestabilan foto Hb dalam larutan penimbal kalium fosfat 0.1 M dijalankan dengan mendedahkan larutan Hb dalam keadaan bercahaya di makmal secara berterusan selama 10 jam dan pengukuran serapan larutan Hb diambil selang 1 jam dengan spektrofotometer ultra lembayung-nampak pada panjang gelombang serapan maksimum 408 nm. Jangka hayat Hb terpegun pada mikrosfera poliakrilat juga dikaji dengan sebanyak 45 unit biosensor telah disediakan pada hari pertama dan ukuran keamatan pantulan bagi 3 unit biosensor terhadap pengesanan 60 mg  $\text{mL}^{-1}$  ion  $\text{NO}_2^-$  pada 668 nm dilakukan selang 3 hari dalam tempoh 45 hari. Kajian kesan gangguan ion terhadap biosensor nitrit dikenal pasti dengan memperkenalkan Hb terpegun kepada beberapa ion gangguan yang biasanya wujud bersama ion  $\text{NO}_2^-$  dalam air semula jadi seperti ion  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Al}^{3+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Cr}^{3+}$ ,  $\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6^{2-}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{V}^{4+}$ ,  $\text{I}^-$ ,  $\text{Ag}^+$ ,  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{Br}^-$  dan  $\text{S}^{2-}$ . Kepekatan ion gangguan yang dtambahkan ke dalam medium tindak balas antara Hb terpegun dan ion  $\text{NO}_2^-$  ditingkatkan daripada 0.01 mg  $\text{mL}^{-1}$  sehingga memberi ralat pantulan relatif sebanyak  $\pm 5\%$  dalam penentuan 25 mg  $\text{mL}^{-1}$  ion  $\text{NO}_2^-$  pada pH 7.0 dan panjang gelombang 668 nm.

#### KEPUTUSAN DAN PERBINCANGAN

Imej SEM dalam Rajah 1 menunjukkan mikrosfera kopolimer poli(*n*BA-NAS) yang terhasil melalui tindak balas fotopempolimeran emulsi mempunyai purata diameter mikrosfera sebanyak 2.6  $\mu\text{m}$ . Pengubahsuaian mikrosfera akrilik dengan kumpulan berfungsi suksinimida membolehkan molekul Hb diikat secara tidak berbalik pada matriks sokongan melalui ikatan kovalen. Bentuk sfera tiga dimensi poli(*n*BA-NAS) mewujudkan luas kawasan permukaan yang besar kepada pemegunan molekul Hb pada kapasiti muatan yang tinggi. Dengan ini, ia meningkatkan tahap kepekaan biosensor terhadap pengesanan analit sasaran. Selain itu, morfologi poli(*n*BA-NAS) berbentuk sfera juga akan memudahkan proses peresapan analit berlaku pada medium tiga dimensi.



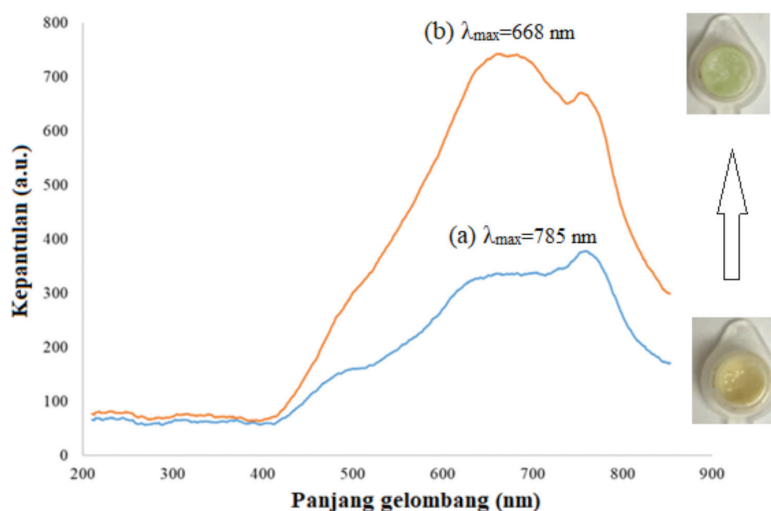
RAJAH 1. Mikrograf SEM poli(*n*BA-NAS) yang diperolehi daripada mikroskop elektron imbasan pada voltan pecutan 3 kV dan pembesaran sebanyak 2 k $\times$

Secara amnya, struktur keseluruhan molekul Hb merangkumi 4 rantaian polipeptida (globin) yang berkait antara satu sama lain. Setiap unit globin Hb mengandungi atom ferum (Fe) di pusat dalam keadaan pengoksidaan +2, iaitu Fe<sup>2+</sup> yang berfungsi menurunkan ion NO<sub>2</sub><sup>-</sup> secara tidak berbalik dan membentuk nitrik oksida (NO). Protein HEM tersebut kemudiannya bergabung dengan NO lalu membentuk kompleks ferum-nitrosil-hemoglobin (HbFe<sup>2+</sup>-NO) berwarna hijau kekuningan. Rajah 2 menunjukkan spektrum pantulan biosensor nitrit berasaskan Hb terpegun pada mikrosfera poliakrilat sebelum (a) dan selepas (b) bertindak balas dengan 60 mg mL<sup>-1</sup> ion NO<sub>2</sub><sup>-</sup> pada pH7.0. Biosensor berasaskan Hb terpegun pada mikrosfera kopolimer poli(*n*BA-NAS) adalah berwarna perang kemerahan sebelum bertindak balas dengan ion NO<sub>2</sub><sup>-</sup> dan menunjukkan keamatan pantulan maksimum pada panjang gelombang ( $\lambda_{max}$ ) 785 nm. Apabila 60 mg mL<sup>-1</sup> ion NO<sub>2</sub><sup>-</sup> ditindak balaskan dengan Hb terpegun, perubahan warna

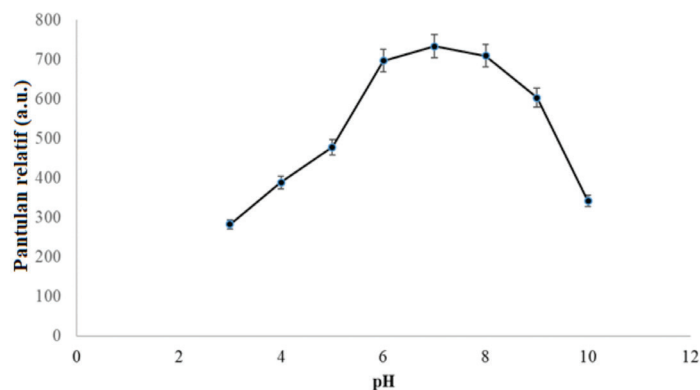
biosensor daripada perang kemerahan ke hijau kekuningan yang lebih terang warnanya telah meningkatkan keamatan pantulan pada  $\lambda_{max}$  pada 668 nm akibat pembentukan kompleks HbFe<sup>2+</sup>-NO terpegun. Spektrum pantulan bagi Hb terpegun (a) dan kompleks terpegunnya selepas bertindak balas dengan 60 mg mL<sup>-1</sup> ion NO<sub>2</sub><sup>-</sup> (b) menunjukkan perbezaan pantulan relatif maksimum pada 668 nm. Oleh itu, analisis pengoptimuman biosensor ion NO<sub>2</sub><sup>-</sup> yang selanjutnya dilakukan berdasarkan panjang gelombang 668 nm.

Bagi tujuan pengoptimuman tindak balas kimia antara Hb terpegun dan ion NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, eksperimen yang melibatkan larutan ion NO<sub>2</sub><sup>-</sup> pada pH berbeza telah dijalankan. Berdasarkan Rajah 3, pH optimum bagi penghasilan kompleks hijau kekuningan HbFe<sup>2+</sup>-NO terpegun didapati pada pH7. Pada pH yang rendah, ia merangsang tindak balas penurunan ion NO<sub>2</sub><sup>-</sup> oleh protein HEM untuk menghasilkan NO, dan kadar penghasilan NO adalah paling maksimum pada pH neutral. Kadar penurunan nitrit spesifik didapati dihalang oleh peningkatan pH dari pH8 hingga pH10 (Cerqueira et al. 2013). Analisis kualitatif yang menggunakan larutan Hb bagi mengesan kehadiran ion NO<sub>2</sub><sup>-</sup> telah pun dilaporkan oleh Aschebrook-Kilfoy et al. (2011) dalam larutan neutral atau sedikit berasid. Dengan itu, medium tindak balas biokimia antara Hb terpegun dan ion NO<sub>2</sub><sup>-</sup> ditetapkan pada pH7 menggunakan larutan penimbal kalium fosfat 0.1 M dalam analisis yang seterusnya.

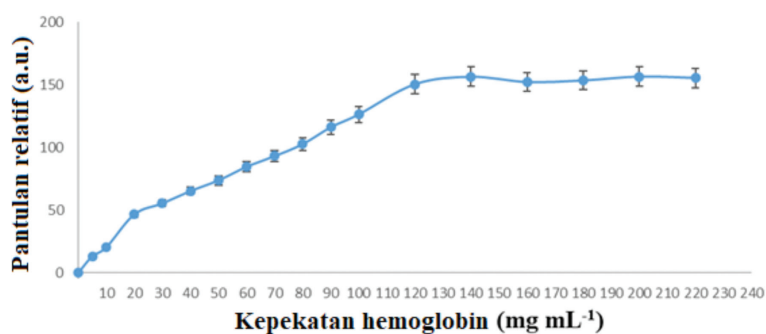
Rajah 4 menunjukkan plot pantulan pembentukan kompleks HbFe<sup>2+</sup>-NO terpegun melawan kepekatan Hb yang digunakan dalam pemegunan Hb pada mikrosfera poliakrilat dalam julat 1-220 mg mL<sup>-1</sup>. Peningkatan kepekatan Hb didapati meningkatkan isyarat kepantulan biosensor pada panjang gelombang 668 nm daripada kepekatan Hb 1 hingga 120 mg mL<sup>-1</sup> akibat peningkatan kadar tindak balas penurunan ion NO<sub>2</sub><sup>-</sup> oleh kompleks HEM ferum. Rangsangan biosensor menjadi hampir malar



RAJAH 2. Spektra pantulan bagi Hb terpegun pada mikrosfera kopolimer poli(*n*BA-NAS) (a) dan kompleks terpegunnya selepas bertindak balas dengan 60 mg mL<sup>-1</sup> NO<sub>2</sub><sup>-</sup> (b) pada pH7.0



RAJAH 3. Kesan pH terhadap rangsangan biosensor dalam penentuan 60 mg mL<sup>-1</sup> ion NO<sub>2</sub><sup>-</sup> menggunakan larutan penimbal kalium fosfat 0.1 M antara pH3 hingga pH10 (*n*=3)



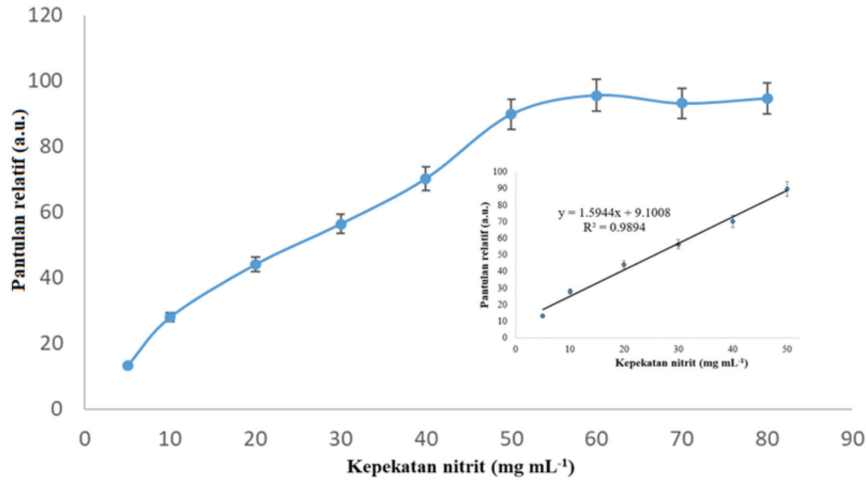
RAJAH 4. Kesan kepekatan Hb dari 1-220 mg mL<sup>-1</sup> dalam penyediaan biosensor nitrit terhadap pengesanan 60 mg mL<sup>-1</sup> ion NO<sub>2</sub><sup>-</sup> pada pH7.0 dan panjang gelombang 668 nm (*n*=3)

apabila kepekatan Hb ditingkatkan daripada 120–220 mg mL<sup>-1</sup> dengan kesemua ion NO<sub>2</sub><sup>-</sup> yang hadir telah digunakan dalam tindak balas pembentukan kompleks dengan Hb dan kepekatan optimum Hb diperoleh pada 120 mg mL<sup>-1</sup>.

Rangsangan biosensor reflektometrik pada panjang gelombang 668 nm terhadap kepekatan ion NO<sub>2</sub><sup>-</sup> berbeza (daripada 5–80 mg mL<sup>-1</sup>) telah dilakukan untuk memperoleh lengkung kalibrasi biosensor nitrit tersebut (Rajah 5). Kenaikan rangsangan optik biosensor didapati selari dengan peningkatan kepekatan ion NO<sub>2</sub><sup>-</sup> daripada 5 hingga 50 mg mL<sup>-1</sup> disebabkan kadar pembentukan kompleks hijau kekuningan HbFe<sup>2+</sup>-NO terpegun semakin meningkat berkadaran dengan peningkatan kepekatan ion NO<sub>2</sub><sup>-</sup>. Rangsangan pantulan relatif biosensor menjadi malar selepas bertindak balas dengan ion NO<sub>2</sub><sup>-</sup> pada kepekatan melebihi 50 mg mL<sup>-1</sup>. Ini menunjukkan kehadiran tapak pemangkinan protein HEM yang sedia ada pada permukaan biosensor telah dipenuhi dengan ion NO<sub>2</sub><sup>-</sup> dan kehadiran ion NO<sub>2</sub><sup>-</sup> yang berlebihan tidak dapat digunakan dalam tindak balas pembentukan kompleks dengan Hb terpegun untuk meningkatkan lagi rangsangan biosensor. Biosensor nitrit menunjukkan julat linear dinamik antara 5 hingga 50 mg mL<sup>-1</sup> ( $R^2=0.9894$ ) dengan had pengesanan (LOD) yang dikira berdasarkan isyarat blank ditambahkan dengan tiga sisihan piawai blank adalah sebanyak 3.3 mg mL<sup>-1</sup>. Kebolehasihan biosensor optik ion NO<sub>2</sub><sup>-</sup> juga adalah memuaskan dengan nilai sisihan piawai relatif (RSD) sebanyak 5.8%.

Untuk menilai keselektifan kaedah yang dicadangkan, kesan ion asing terhadap penentuan nitrit telah dikaji dengan menambah ion asing dalam beberapa kepekatan tertentu ke dalam 25 mg mL<sup>-1</sup> larutan ion NO<sub>2</sub><sup>-</sup>. Penentuan nitrit dijalankan dengan menggunakan biosensor reflektometrik terbangun di bawah keadaan optimum. Keputusan dalam Jadual 1 jelas menunjukkan bahawa kebanyakan ion yang sering wujud bersama nitrit dalam sampel air semula jadi hanya menunjukkan kesan gangguan terhadap penentuan ion NO<sub>2</sub><sup>-</sup> pada kepekatan yang tinggi. Walau bagaimanapun, ion Hg<sup>2+</sup>, Ag<sup>+</sup>, Br<sup>-</sup> dan S<sup>2-</sup> mempunyai had toleransi yang lebih rendah. Masalah kesan gangguan ion ini boleh diatasi dengan menggunakan agen penopeng seperti asid askorbik dan asid etilenadiaminatetraasetik (EDTA) yang sering digunakan sebagai agen pengkelat yang boleh membentuk kompleks dengan pelbagai ion logam. Majoriti ion asing yang dinyatakan dalam Jadual 1 biasanya dijumpai dalam air semula jadi pada kepekatan yang rendah. Oleh itu, kaedah biosensor optik yang dicadangkan masih boleh digunakan untuk menentukan kepekatan nitrit dalam sampel air persekitaran (Butler 2014).

Satu kajian berkaitan kestabilan foto reagen telah dijalankan bagi memantau kemungkinan molekul Hb dalam larutan penimbal kalium fosfat 0.1 M mengalami penguraian apabila didedahkan secara berterusan kepada punca cahaya dalam jangka masa yang lama. Untuk tempoh pemantauan berterusan selama 10 jam, nilai RSD



RAJAH 5. Lengkung rangsangan biosensor terhadap kepekatan ion  $\text{NO}_2^-$  dari 5 hingga 80  $\text{mg mL}^{-1}$  pada pH7.0 dan panjang gelombang 668 nm ( $n=3$ ). Rajah sisipan menunjukkan rangsangan linear biosensor dalam julat 5-50  $\text{mg mL}^{-1}$  ion  $\text{NO}_2^-$  ( $n=3$ )

JADUAL 1. Kesan ion asing terhadap penentuan 25  $\text{mg mL}^{-1}$  ion  $\text{NO}_2^-$  pada pH7.0 dan panjang gelombang 668 nm menggunakan kaedah biosensor reflektometrik ( $n=3$ )

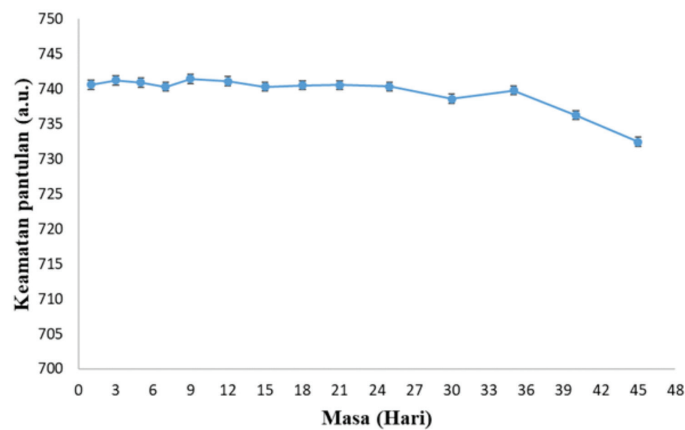
Ion gangguan	Had toleransi ( $\text{mg mL}^{-1}$ )
$\text{Ca}^{2+}$ , $\text{Mg}^{2+}$	150
$\text{Al}^{3+}$ , $\text{Cu}^{2+}$	150
$\text{Fe}^{3+}$ , $\text{Mn}^{2+}$	50
$\text{Cl}^-$	300
$\text{Cr}^{3+}$	30
$\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6^{2-}$	20
$\text{Pb}^{2+}$ , $\text{Fe}^{2+}$ , $\text{V}^{4+}$ , $\text{I}^-$	2.5
$\text{Ag}^+$	0.3
$\text{Hg}^{2+}$ , $\text{Br}^-$	0.15
$\text{S}^{2-}$	0.01

jangka hayat dijalankan dengan memerhatikan keupayaan Hb terpegun untuk memberi bacaan keamatan pantulan yang maksimum selama 45 hari dengan isyarat biosensor diambil selang tiga hari. Untuk jangka hayat biosensor nitrit yang dibangunkan berdasarkan Hb terpegun pada mikrosfera poliakrilat, biosensor menunjukkan ukuran pantulan yang tinggi dan stabil terhadap penentuan 60  $\text{mg mL}^{-1}$  ion  $\text{NO}_2^-$  pada 668 nm sehingga hari ke-36 (Rajah 6) dan rangsangan biosensor mula menurun kepada 90% daripada isyarat asal biosensor selepas 36 hari penyimpanan biosensor. Hal ini menunjukkan molekul Hb terpegun kemungkinan mengalami penguraian tidak berbalik selepas disimpan dalam jangka masa melebihi sebulan. Dengan itu, biosensor optik tersebut mempunyai kestabilan operasi selama ~sebulan.

serendah 2.1% diperoleh menunjukkan Hb dalam larutan bebas adalah cukup stabil walaupun terdedah kepada sumber cahaya selama 10 jam pada suhu 25°C. Kajian

KESIMPULAN

Biosensor optik nitrit yang dibangunkan berasaskan Hb terpegun pada mikrosfera poliakrilat menunjukkan



RAJAH 6. Profil jangka hayat biosensor ion  $\text{NO}_2^-$  optik berasaskan Hb terpegun pada mikrosfera mikrosfera poliakrilat ( $n=3$ )

perubahan keamatan warna yang berkadar selari dengan kepekatan nitrit dalam larutan akueus. Oleh itu, biosensor optik terbangun mempunyai potensi untuk digunakan dalam penentuan semikuantitatif paras nitrit dalam sampel air persekitaran berdasarkan skala warna visual. Sebagai sebuah alat pengesan kepekatan ion  $\text{NO}_2^-$  yang mudah diguna pakai oleh sesiapa sahaja akan mewujudkan kesedaran terhadap kepentingan menjaga kualiti air persekitaran. Bekalan air bersih yang mencukupi menjadi prasyarat kepada pembangunan ekonomi, pembasmian kemiskinan sekaligus meningkatkan kualiti hidup masyarakat

#### PENGHARGAAN

Penghargaan dan terima kasih yang tidak terhingga kepada Kementerian Pendidikan Tinggi yang telah membiayai Skim Geran Penyelidikan Fundamental (FRGS) dengan kod projek penyelidikan FRGS/2/2014/SG01/UKM/02/1.

#### RUJUKAN

- Aschebrook-Kilfoy, B., Cross, A.J., Stolzenberg-Solomon, R.Z., Schatzkin, A., Hollenbeck, A. R., Sinha, R. & Ward, M.H. 2011. Pancreatic cancer and exposure to dietary nitrate and nitrite in the NIH-AARP diet and health study. *American Journal of Epidemiology* 174(3): 305-315.
- Bryan, N.S., Alexander, D.D., Coughlin, J.R., Milkowski, A.L. & Boffetta, P. 2012. Ingested nitrate and nitrite and stomach cancer risk: An updated review. *Food and Chemical Toxicology* 50(10): 3646-3665.
- Butler, A. 2014. Nitrites and nitrates in the human diet: Carcinogens or beneficial hypotensive agents? *Journal of Ethnopharmacology* 167: 105-107.
- Cerqueira, B.A., Boas, W.V., Santana, S.S., Reis, J.O. & Goncalves, M.S. 2013. Nitrite levels are associated to fetal hemoglobin concentration in patients with sickle cell anemia: Implications in inflammatory process. *Blood* 122(21): 4666-4666.
- Koedrith, P., Thasiphu, T., Weon, J.I., Boonprasert, R., Tuitemwong, K. & Tuitemwong, P. 2015. Recent trends in rapid environmental monitoring of pathogens and toxicants: Potential of nanoparticle-based biosensor and applications. *The Scientific World Journal* 2015: 1-12.
- Moorcroft, M.J., Davis, J. & Compton, R.G. 2001. Detection and determination of nitrate and nitrite: A review. *Talanta* 54(5): 785-803.
- Quek, M.C., Chin, N.L., Yusof, Y.A., Tan, S.W. & Law, C.L. 2015. Preliminary nitrite, nitrate and colour analysis of Malaysian edible bird's nest. *Information Processing in Agriculture* 2(1): 1-5.
- Raja Dato' Zaharaton, R.Z.A. 2004. Water resources management in Malaysia: The way forward. *Asia Water Conference* 2004: 1-8.
- Robert, C.W. 1972. *Handbook of Chemistry and Physics*. Edisi Ke-53. Cranwood Parkway: The Chemical Rubber Co.
- Samaneh, K., Rafiee, Z., Amin, M.M., Poursafa, P., Mansourian, M. & Modaberi, A. 2013. Association of nitrate, nitrite, and total organic carbon (toc) in drinking water and gastrointestinal disease. *Journal of Environmental and Public Health* 2013: 1-4.
- Tereshchenko, A., Bechelany, M., Viter, R., Khranovskyy, V., Smyntyna, V., Starodub, N. & Yakimova, R. 2016. Optical biosensors based on ZnO nanostructures: Advantages and perspectives. *Sensors and Actuators B: Chemical* 229: 664-677.
- Ward, M.H., deKok, T.M. & Levallois, P. 2005. Workgroup report: Drinking-water nitrate and health - recent findings and research needs. *Environmental Health Perspective* 113(11): 1607-1614.
- Wen, G., Wen, X., Shuang, S. & Choi, M.M.F. 2014. Whole-cell biosensor for determination of methanol. *Sensors and Actuators B: Chemical* 201(0): 586-591.
- Syamimi Haslan, Ling Ling Tan\*, Lee Yook Heng & Goh Choo Ta  
Pusat Kajian Bencana Asia Tenggara (SEADPRI-UKM)  
Institut Alam Sekitar dan Pembangunan (LESTARI)  
Universiti Kebangsaan Malaysia  
43600 UKM Bangi, Selangor Darul Ehsan  
Malaysia
- Lee Yook Heng  
Pusat Pengajian Sains Kimia dan Teknologi Makanan  
Fakulti Sains dan Teknologi  
Universiti Kebangsaan Malaysia  
43600 UKM Bangi, Selangor Darul Ehsan  
Malaysia

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

Diserahkan: 13 April 2018

Diterima: 18 Mei 2018