

Biosensor DNA Elektrokimia Berasaskan Nanokomposit Silika-Emas untuk Penentuan Ultrasensitif *E. coli* Patogen dalam Sayuran dan Air Persekitaran

Electrochemical DNA Biosensor Based on Silica-Gold Nanocomposite for Ultrasensitive Quantitation of Pathogenic *E. coli* in Vegetable and Environmental Water

LING LING TAN¹, DEDI FUTRA^{2,3,*} & LEE YOOK HENG²

¹*Pusat Kajian Bencana Asia Tenggara (SEADPRI), Institut Alam Sekitar dan Pembangunan (LESTARI), Universiti Kebangsaan Malaysia, 43600 UKM Bangi, Selangor, Malaysia*

²*Jabatan Sains Kimia, Fakulti Sains dan Teknologi, Universiti Kebangsaan Malaysia, 43600 UKM Bangi, Selangor, Malaysia*

³*Department of Chemistry Education, Faculty of Education, Universitas Riau, Kampus Binawidya KM 12.5 Pekanbaru, 28131, Riau, Indonesia*

Diserahkan: 27 Disember 2024/Diterima: 23 Jun 2025

ABSTRAK

Escherichia coli lazimnya digunakan sebagai organisma penunjuk untuk menilai kualiti air dan pencemaran patogen enterik di perairan. Mengesan bakteria najis, seperti *E. coli* O157:H7 yang mempunyai ciri virulensi yang akan menyebabkan kesan patogen pada manusia adalah lebih membimbangkan orang biasa. Di sini, biosensor DNA elektrokimia ultrasensitif berasaskan nanokomposit silika-emas (Si-Au) telah disediakan untuk penentuan khusus jujukan DNA *E. coli* dalam sampel sayuran segar dan air daripada pelbagai sumber, contohnya sungai, laut, paip dan air mineral. Elektrod pes karbon bercetak skrin (SPCE) telah diubahsuai dengan lapisan nanozarah emas (AuNPs) untuk menggalakkan pemindahan elektron secara langsung antara label oligonukleotida antrakuinona elektroaktif dan elektrod SPCE. Nanosfera silika terubah suai dengan kumpulan berfungsi amina (SiNPs) telah disintesis melalui teknik sonikasi satu langkah yang mudah dan dijerap secara fizikal pada SPCE terubah suai AuNPs untuk membentuk elektrod nanokomposit Si-Au (Si-Au-SPCE). Biosensor DNA elektrokimia terbangun mampu mengesan kuantiti DNA sasaran *E. coli* pada paras rendah dalam julat kepekatan 1.0×10^{-16} - 1.0×10^{-9} M cDNA dengan had pengesanan (LOD) pada 0.13 aM. LOD yang dilaporkan dalam kajian ini adalah sekurang-kurangnya 10 kali ganda lebih rendah daripada kebanyakan biosensor DNA elektrokimia yang dilaporkan dalam kajian lepas setakat ini. Kuantifikasi DNA *E. coli* hanya memerlukan kira-kira 30 minit dan biosensor DNA menunjukkan kestabilan operasi selama 2 bulan. Nanokomposit Si-Au boleh berfungsi sebagai bahan termaju yang berpotensi untuk biosensor DNA berprestasi tinggi seperti yang dibuktikan melalui kajian kuantitatif kepekatan DNA *E. coli* dalam sampel sayuran mentah dan air persekitaran dengan hampir 100% perolehan semula kepekatan cDNA *E. coli* yang ditambahkan dalam sampel.

Kata kunci: Air persekitaran; biosensor DNA elektrokimia; *Escherichia coli*; nanosfera silika; nanozarah emas

ABSTRACT

Escherichia coli is commonly used as an indicator organism for assessing water quality and enteric pathogenic contamination in waters. Detecting fecal bacteria, such as *E. coli* O157:H7 that had acquired virulence characteristics, which would cause pathogenicity in humans is of more concern to the average people. Herein, an ultrasensitive electrochemical DNA biosensor based on silica-gold (Si-Au) nanocomposite was prepared for sequence-specific detection of *E. coli* DNA in fresh vegetable and water samples from various sources (river, marine, tap, and mineral waters). The screen-printed carbon paste electrode (SPCE) was modified with a layer of gold nanoparticles (AuNPs) to promote direct electron transfer between the electroactive anthraquinone oligonucleotide label and the SPCE electrode. Amine-functionalized silica nanospheres (SiNPs) were synthesized via a facile single-step sonication technique, and physically absorbed onto the AuNPs-modified SPCE to form Si-Au nanocomposite electrode (Si-Au-SPCE). The electrochemical DNA biosensor was capable of low levels of *E. coli* target DNA quantitation in the concentration range of 1.0×10^{-16} - 1.0×10^{-9} M cDNA, with a limit of detection (LOD) at 0.13 aM. The LOD reported in this work is at least 10 times better than many reported electrochemical DNA biosensors in the literature so far. The quantification of *E. coli* DNA requires only about 30 min and the DNA biosensor showed operational stability for 2 months. The Si-Au nanocomposite could serve as a promising material for high-performance DNA biosensor

as proven through the quantitation of *E. coli* DNA concentration in raw vegetable and water samples with close to 100% recoveries of the spiked *E. coli* cDNA concentration.

Keywords: Electrochemical DNA biosensor; environmental waters; *Escherichia coli*; gold nanoparticles; silica nanospheres

PENGENALAN

Patogen bakteria bawaan makanan dan air menyumbang kepada isu kesihatan utama di seluruh dunia akibat pengambilan makanan dan air yang tercemar najis (Gambushe, Zishiri & Zowalaty 2022). Kompos atau baja ladang yang tercemar, air sisa industri, kumbahan domestik, banjir dan air larian permukaan boleh menyebabkan kerosakan pada tanaman sayuran dan kualiti bekalan air. Akibatnya, kehadiran koliform najis yang berasal daripada najis boleh merebak kepada manusia melalui penularan daripada air dan makanan (Ormsby et al. 2023; Razmi et al. 2020). Wabak disebabkan bakteria *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157:H7 dan *Salmonella* spp., misalnya, adalah berkaitan dengan makanan dan air yang tercemar oleh patogen bawaan makanan dan air (Petersen & Hubbart 2020).

E. coli ialah bakteria Gram-negatif yang mendiami usus manusia dan haiwan dan ia membantu mencerna makanan dan mensintesis vitamin K dan vitamin B12 untuk badan. Walau bagaimanapun, beberapa strain patogen *E. coli* telah didapati menyebabkan penyakit serius pada manusia. *E. coli* O157:H7 dikenali sebagai jenis *E. coli* strain yang paling teruk. Ia dikaji secara intensif kerana ia menghasilkan toksin yang boleh merosakkan membran usus dan menyebabkan anemia, kekejangan perut, cirit-birit berdarah, sindrom uremik hemolitik dan purpura trombositopenik trombotik (Bonten et al. 2021; Braz, Melchior & Moreira 2020; Osínska et al. 2023). Biasanya, penyakit yang disebabkan oleh bakteria *E. coli* O157:H7 sering salah didiagnosis dan melibatkan satu siri ujian susulan perubatan yang invasif dan mahal sebelum mencapai diagnosis yang tepat. Wabak *E. coli* O157:H7 lazimnya dikaitkan dengan pengambilan daging yang tidak dimasak dengan sepenuhnya, susu tanpa proses pasteurisasi, buah-buahan dan sayur-sayuran segar serta air tidak berklorin (Razmi et al. 2020; Riva et al. 2020).

Kaedah tradisi untuk penentuan bakteria *E. coli* adalah berdasarkan teknik mikrobiologi dengan mikrob ditumbuhkan pada plat agar terpilih dan koloni yang dikenal pasti diasingkan berdasarkan ciri morfologi, biokimia dan imunologi (Lu & Breidt 2015; Rahimi et al. 2012). Walau bagaimanapun, kaedah ujian berasaskan pengkulturan sel adalah sukar dan memerlukan keadaan steril yang ketat. Kaedah berasaskan tindak balas rantai polimerase (PCR) juga biasanya digunakan dalam penentuan khusus DNA *E. coli* dalam sampel biologi (Garrido et al. 2013). Namun, kelemahan utama yang dikenal pasti adalah seperti memakan masa dan melibatkan penggunaan bahan kimia toksik yang berkemungkinan boleh merencat atau

mengganggu proses amplifikasi PCR. Selain itu, pelbagai kaedah analisis lain juga telah digunakan untuk pengesanan *E. coli* patogen dalam sampel persekitaran yang berbeza termasuk teknik mikrofluidik (Stokes, Griffin & Vo-Dinh 2001), strategi optik (Dester, Kao & Alocijia 2022), teknik kimiluminesen janaan elektrokimia (ECL) (Guo et al. 2013), kaedahimbangan mikro kristal kuarza (Mao et al. 2006), strategi piezoelektrik (Jiang et al. 2008) dan teknik biosensor elektrokimia (El-Moghazy et al. 2022; Geng et al. 2011; Li et al. 2011; Pandey et al. 2011; Razni et al. 2020; Zheng et al. 2024). Antara teknik ini, strategi biosensor DNA elektrokimia dikenal pasti sebagai kaedah alternatif yang baik untuk pengesanan pantas DNA *E. coli* kerana prosedurnya yang mudah, dimensi kecil dan selektiviti tinggi serta hibridisasi DNA antara prob DNA dan jujukan DNA pelengkap (cDNA) yang khusus.

Dengan kemajuan sains nano dan nanoteknologi yang berkembang dengan pantas, pelbagai jenis bahan nano kejuruteraan biosensor telah disintesis untuk membentuk biokonjugasi dengan DNA dalam pembangunan biosensor DNA berprestasi tinggi dengan kepekaan dan kepilahan yang baik terhadap DNA sasaran. Nanosfera silika (SiNPs) telah digunakan secara meluas dalam biopengesanan kerana nisbah luas permukaan kepada isi padu yang tinggi, kimia permukaan yang kaya, kestabilan yang tinggi dan kaedah penyediaan yang mudah. Bae et al. (2010) telah membangunkan biosensor DNA berdasarkan strategi ECL untuk pengesanan tindak balas hibridisasi DNA dengan menggunakan SiNPs yang didop dengan tris(bipiridina) rutenium(II) $[Ru(bpy)_3^{2+}]$ serta disalut dengan cDNA sebagai penunjuk dan menunjukkan had pengesanan yang sangat rendah sehingga 1 fM. Li et al. (2014) juga telah menggunakan SiNPs berdop $Ru(bpy)_3^{2+}$ untuk pengesanan adenosina trifosfat berdasarkan aptasensor ECL menggunakan elektrod karbon berkaca diubah suai emas nanoporos dengan had pengesanan serendah 0.03 pM. Aptasensor elektrokimia telah dilaporkan oleh Li et al. (2012) adalah berdasarkan kuantum dot kadmium telurium (CdTe QDs) bersalut SiNPs untuk pengesanan trombin. Aptasensornya yang disediakan melalui monolapisan aptamer berkumpulan berfungsi tiol pada elektrod emas bercetak skrin diubah suai SiNPs mampu mengesan tahap rendah trombin pada <1 ppb. Platform pengesanan DNA bersepadu yang dibina daripada hibrid nanozarah grafena-mesoporos silika-emas oleh Du et al. (2011) dapat mencapai had pengesanan yang rendah pada tahap pM.

Dalam kajian ini, biosensor DNA elektrokimia ultrasensitif telah direka bentuk berdasarkan elektrod pes karbon bercetak skrin yang diubah suai dengan

nanokomposit silika-emas (Si-Au-SPCE) untuk penentuan *E. coli* O157:H7 patogen dalam sampel air persekitaran dan sayuran mentah. Elektrod SPCE disalut dengan lapisan nano zarah emas koloid (AuNPs) untuk meningkatkan tindakan balas pemindahan elektron sebelum disalut dengan lapisan SiNPs dengan kumpulan berfungsi amina sebagai matriks pemegungan DNA. Prob DNA dipegunkan pada elektrod Si-Au-SPCE melalui ikatan kovalen imina menggunakan agen taut-silang glutaraldehid (GA). Prob redoks asid monosulfonik antrakuinona (AQMS) digunakan sebagai label hibridisasi DNA dan rangsangan elektrokimia biosensor DNA dipantau dengan teknik voltammetri denyutan pembezaan (DPV). Luas permukaan tinggi SiNPs yang tersebar mono membenarkan peresapan homogen analit pada permukaan elektrod nanokomposit Si-Au dan memberikan peningkatan yang ketara kepada prestasi analisis biosensor DNA dari segi had pengesanan, julat rangsangan linear, masa rangsangan, kebolehlulangan dan kestabilan jangka panjang biosensor dalam penentuan *E. coli* O157:H7 patogen dalam sampel air persekitaran dan sayuran mentah.

BAHAN DAN KAEDAH

RADAS DAN ELEKTROD

Uji kaji elektrokimia DPV dijalankan menggunakan potentiostat/galvanostat Metrohm Autolab (Model PGSTAT 12, Belanda) dengan sistem tiga elektrod pada suhu ambien (25 °C) dalam julat keupayaan -0.85 V hingga -0.15 V dan keupayaan langkah pada 0.02 V. Elektrod SPCE berasaskan pes karbon yang dibekalkan oleh Scrint Technology (M) Sdn. Bhd. diubah suai dengan nanokomposit Si-Au dan DNA dan digunakan sebagai elektrod kerja. Elektrod rujukan argentum/argentum klorida (Ag/AgCl) dengan $c(\text{KCl})=3 \text{ mol L}^{-1}$ elektrolit rujukan digunakan sebagai elektrod rujukan dan elektrod karbon berkapasitansi digunakan sebagai elektrod lawan.

REAGEN DAN LARUTAN

Larutan penimbal kalium fosfat (K-fosfat) pada 0.05 M dan pH 7.0 disediakan dengan mencampurkan larutan dipotassium fosfat (K_2HPO_4 , Fluka) 0.1 M dan kalium dihidrogen fosfat (KH_2PO_4 , Fluka) 0.1 M pada isi padu yang sesuai dalam air terenyahion. 3-aminopropiltriethoxysilane (APTS, 99%), glutaraldehid (GA, 25%), nano zarah emas (AuNPs) dan natrium klorida (NaCl) diperolehi daripada Sigma-Aldrich. Larutan ammonia 25%, etanol dan natrium hidroksida (NaOH) dibekalkan oleh System. Garam natrium antrakuinona-2-asid sulfonik monohidrat (AQMS) dan tetraetil ortosilikat (TEOS) masing-masing diperolehi daripada Acrosss dan Fluka. Jujukan oligonukleotida prob DNA khusus kepada patogen *E. coli* O157:H7, DNA pelengkap (cDNA), DNA bukan pelengkap (ncDNA) dan

DNA tidak sepadan bes tunggal (1-bDNA) yang digunakan dalam kajian ini disenaraikan dalam Jadual S1. Larutan stok prob DNA 100 μM (Sigma) disediakan dengan menggunakan larutan penimbal K-fosfat 0.05 M (pH 7.0), manakala larutan stok cDNA, ncDNA dan 1-bDNA pada kepekatan 100 μM disediakan dalam larutan penimbal natrium fosfat (Na-fosfat) 0.05 M pada pH 7.0.

SINTESIS SiNPs DENGAN KUMPULAN BERFUNGSI AMINA

SiNPs telah disintesis menggunakan kaedah pengemulsian yang mudah mengikut prosedur yang dilaporkan oleh Mahirah et al. (2020) dan Tang et al. (2011) dengan sedikit pengubahsuaian. Sebanyak 2 mL air terenyahion dicampur dengan 5 mL larutan ammonia dan disonikasi selama 10 minit pada suhu bilik (25 °C), diikuti dengan menambah 2 mL TEOS dan 4 mL etanol ke dalam campuran tersebut dan disonikasi lagi selama 30 minit pada suhu 55 °C. 2 mL APTS kemudian ditambahkan kepada ampai SiNPs dan dikacau semalaman menggunakan pengacau magnet (IKA 9500100 C-Mag HS7, Jerman) pada keadaan ambien. Hasil SiNPs dengan kumpulan berfungsi amina kemudiannya diempar pada kelajuan 4000 rpm selama 30 minit dan dibasuh dengan etanol dan larutan penimbal K-fosfat 0.05 M pada pH 7.0 sebelum dikeringkan pada suhu bilik. Ampaian SiNPs yang telah diubah suai dengan APTS disediakan dengan menambahkan 500 μL etanol kepada 7 mg hasil SiNPs tersebut.

PENYEDIAAN BIOKONJUGAT SiNPs-PROB DNA TERPEGUN

Sebanyak 10 μL ampai AuNPs daripada stoknya pada kepekatan 1 mg AuNPs/300 μL etanol disalutkan pada permukaan SPCE menggunakan mikropipet dan dikeringkan pada suhu 25 °C. Kemudian, 2 μL ampai SiNPs disalut pada permukaan SPCE yang telah dipegunkan dengan lapisan AuNPs dan dibiarkan kering pada suhu bilik. Elektrod SPCE yang diubah suai dengan nanokomposit silika-emas (Si-Au-SPCE) kemudian direndamkan dalam 300 μL glutaraldehid (GA) 5% selama sejam dan dibasuh dengan larutan penimbal K-fosfat 0.05 M pada pH 7.0. Elektrod Si-Au-SPE yang telah diubah suai dengan GA kemudiannya dicelupkan ke dalam 300 μL larutan prob DNA 3 μM selama 5 jam untuk memaut silang prob DNA pada kumpulan berfungsi amina elektrod Si-Au-SPCE lalu dibilas dengan larutan penimbal K-fosfat 0.05 M pada pH neutral. Biokonjugat SiNPs-prob DNA terpegun kemudian diinkubasi dalam 300 μL larutan cDNA yang mengandungi NaCl 1 M dan AQMS 1 mM selama 45 minit untuk membolehkan tindak balas hibridisasi DNA berlaku dan dibilas dengan larutan penimbal K-fosfat 0.05 M (pH 7.0) diikuti dengan pengeringan dalam SDS 0.1% selama 5 minit untuk menyingkirkan DNA sasaran yang terjerap secara fizikal. Pengukuran elektrokimia dilakukan dalam 4.5 mL larutan penimbal K-fosfat 0.05 M pada pH 7.0 pada keadaan ambien.

PENGOPTIMUMAN KEADAAN OPERASI BIOSENSOR DNA *E. coli* ELEKTROKIMIA

Muatan matriks pemegun biosensor DNA *E. coli* elektrokimia dioptimumkan dengan mengubah amaun AuNPs dan SiNPs masing-masingnya dalam julat muatan 0.0015-0.0500 mg dan 0.0020-0.0200 mg pada permukaan elektrod SPCE. Muatan prob DNA kemudiannya dioptimumkan daripada 0.5-5.0 μM pada elektrod Si-Au-SPCE, manakala masa pemegunan prob DNA ditentukan dengan mengeramkan elektrod Si-Au-SPCE dalam larutan prob DNA 3 μM dari 1-16 jam. Pengoptimuman masa dan suhu tindak balas penghibridan DNA telah dijalankan dengan merendam biokonjugat SiNPs-prob DNA terpegun masing-masing dalam larutan cDNA 1.0×10^{-6} μM dari 15-300 minit dan 16-60 °C. Kapasiti penimbal dan kekuatan ion optimum ditentukan dengan mengubah kepekatan larutan penimbal Na-fosfat dan kepekatan larutan NaCl masing-masing daripada 0.005-0.400 M dan 0.1-2.5 M. Kesan pH terhadap rangsangan elektrokimia hibridisasi DNA telah diuji dengan mengubah pH larutan penimbal Na-fosfat 0.05 M daripada pH 5.5-8.5. Semua pengukuran elektrokimia DPV dilakukan dalam triplikat.

PENCIRIAN RANGSANGAN ELEKTROKIMIA HIBRIDISASI DNA

Julat linear dinamik biosensor DNA *E. coli* ditentukan dengan menggunakan satu siri kepekatan cDNA yang disediakan daripada 1.0×10^{-11} M hingga 1.0×10^{-3} μM pada pH 6.5. Rangsangan DPV biosensor DNA diambil pada 45 minit selepas tindak balas hibridisasi DNA berlaku pada keadaan ambien. Kebolehlulangan isyarat biosensor DNA elektrokimia dipantau menggunakan 1.0×10^{-12} M dan 1.0×10^{-9} M cDNA untuk 10 individu biosensor DNA yang disediakan dengan protokol penyediaan yang sama. Kajian kepilahan biosensor DNA telah dijalankan menggunakan 1-bDNA, ncDNA dan cDNA pada kepekatan 5.0×10^{-6} M dan 5.0×10^{-7} M. Jangka hayat biosensor DNA elektrokimia berasaskan nanokomposit Si-Au dikaji dengan mengukur rangsangan DPV dalam tempoh empat bulan terhadap pengesanan 1.0×10^{-10} M cDNA. Tiga unit biosensor DNA digunakan dalam setiap pengukuran rangsangan DPV sehingga pengurangan ketara dalam rangsangan voltametri biosensor DNA diperhatikan dalam kajian kestabilan jangka panjang biosensor DNA. Kajian penjana semula biosensor DNA dijalankan dengan merendam elektrod Si-Au-SPCE terpegun dengan prob DNA secara berselang-seli ke dalam larutan cDNA 1.0×10^{-9} M yang mengandungi NaCl 1M dan AQMS 1 mM selama 30 minit dan larutan penjana semula NaOH 0.1 M selama 15 minit pada 25 °C untuk enam kitaran berturut-turut. Rangsangan DPV biosensor DNA diukur selepas setiap langkah rendaman elektrod DNA dalam larutan penimbal K-fosfat 0.05 M pada pH 7.0.

PENGESANAN *E. coli* DALAM SAMPEL SAYURAN SEGAR DAN AIR PERSEKITARAN

Lima sampel air diambil dari Pantai Cenang, Kedah, Langkawi dan Sungai Langat, Selangor selepas hujan lebat di Semenanjung Malaysia, manakala sampel air paip (dua sampel) dan air mineral (dua sampel) masing-masing diambil daripada paip air makmal dan pasar domestik. Kira-kira 1 mM AQMS dan 1 M NaCl telah ditambah kepada setiap sampel air. Sebanyak 400 μL setiap sampel air telah disonikasi pada 25 °C selama 20 minit untuk melepaskan DNA *E. coli* dan seterusnya bertindak balas dengan prob DNA terpegun pada suhu bilik selama 30 minit sebelum rangsangan DPV biosensor DNA diukur dengan potensiostat. Selain itu, lima sampel sayur kubis (*Brassica oleracea* L.) juga telah diperolehi daripada lima pasar domestik yang berbeza. Kira-kira 1 g bagi setiap sampel kubis direndam dalam 10 mL air ternyahion steril, diikuti dengan vorteks selama 5 minit pada suhu bilik dan rangsangan voltametriknya diukur dengan biosensor DNA *E. coli* elektrokimia yang dicadangkan. Penentuan bakteria *E. coli* dalam sampel air dan sayuran juga dijalankan dengan menggunakan agar selektif koliform. Perubahan warna koloni bakteria daripada biru tua kepada ungu mengesahkan kehadiran bakteria *E. coli*. Akhir sekali, perolehan semula kepekatan cDNA yang ditambahkan ke dalam kedua-dua sampel air persekitaran dan sayuran telah dilakukan menggunakan biosensor DNA *E. coli* elektrokimia voltametri yang dibangunkan.

HASIL DAN PERBINCANGAN

RANGSANGAN ELEKTROKIMIA BIOKONJUGAT SiNPs-PROB DNA TERPEGUN

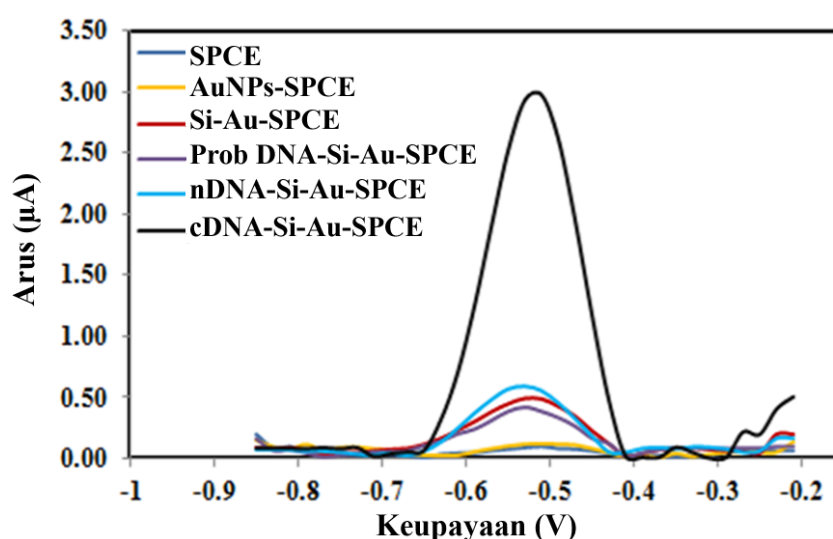
Rajah 1 menunjukkan rangsangan DPV biosensor DNA *E. coli* menggunakan penunjuk redoks AQMS 1 mM sebelum dan selepas penghibridan dengan cDNA dan ncDNA. Rangsangan voltametri tertinggi ditunjukkan oleh elektrod Si-Au-SPCE hasil tindak balas hibridisasi DNA antara biokonjugat SiNPs-prob DNA terpegun dan cDNA. Ini menunjukkan bahawa prob DNA telah berjaya dipegunkan secara ikatan kovalen pada SiNPs melalui agen penghubung silang glutaraldehid dengan itu membolehkan tindak balas hibridisasi DNA dan interkalasi label redoks AQMS ke dalam DNA beban ganda dua (dsDNA) terpegun berlaku. Ikatan kovalen imina yang terbentuk antara kumpulan berfungsi amina zarah silika dan kumpulan berfungsi aldehid glutaraldehid telah ditunjukkan dalam kajian sebelum menggunakan kaedah spektroskopi ATR-FTIR dalam pembangunan aptasensor optik berasaskan pemegunan aptamer DNA G-kuadrupleks pada mikrosfera silika berongga (Mahirah et al. 2020). Rangsangan DPV yang rendah ditunjukkan oleh kehadiran ncDNA pada permukaan elektrod Si-Au-SPCE terpegun

prob DNA disebabkan oleh tindak balas hibridisasi DNA bukan pelengkap serta kadar tindak balas interkalasi penunjuk redoks AQMS yang rendah ke dalam struktur DNA dupleks terpegun. Elektrod Si-Au-SPCE yang diubah suai dengan prob DNA memberikan isyarat arus puncak DPV yang rendah disebabkan oleh tolakan elektrostatik yang berlaku antara kedua-dua molekul AQMS yang bercas negatif dan prob DNA terpegun. Elektrod Si-Au-SPCE, Au-SPCE dan SPCE menunjukkan rangsangan arus puncak DPV yang agak rendah mencadangkan tiada interaksi tidak khusus penunjuk hibridisasi DNA AQMS pada permukaan elektrod.

PENGOPTIMUMAN RANGSANGAN BIOSENSOR DNA *E. coli* ELEKTROKIMIA

Untuk mendapat rangsangan biosensor DNA elektrokimia yang optimum, keadaan uji kaji termasuk muatan AuNPs, SiNPs dan prob DNA serta suhu hibridisasi DNA telah dioptimumkan. Seperti yang ditunjukkan dalam Rajah S1a, rangsangan DPV biosensor DNA meningkat apabila amaun AuNPs yang dimuatkan pada permukaan SPCE meningkat daripada 1.5×10^{-3} mg kepada 3.5×10^{-3} mg. Ini kerana peningkatan amaun AuNPs terpegun pada permukaan elektrod boleh meningkatkan kadar pemindahan elektron yang dipermudahkan oleh peningkatan laluan konduktif yang dihasilkan oleh muatan AuNPs yang semakin meningkat (Nahdya et al. 2022). Walau bagaimanapun, rangsangan voltametrik biosensor DNA merosot apabila muatan AuNPs terpegun melebihi 3.5×10^{-3} mg disebabkan oleh amaun AuNPs yang berlebihan yang dimuatkan pada

permukaan elektrod SPCE dan menghasilkan rintangan bagi pemindahan elektron secara berkesan antara penunjuk redoks AQMS dan permukaan elektrod (Eka et al. 2022). Trend rangsangan biosensor DNA elektrokimia yang serupa juga diperhatikan untuk kesan muatan SiNPs dengan rangsangan biosensor DNA meningkat secara berkadaran dengan peningkatan muatan SiNPs antara 2.0×10^{-3} mg dan 12.0×10^{-3} mg (Rajah S1b), yang dikaitkan dengan amaun prob DNA terpegun yang meningkat pada permukaan SiNPs untuk tindak balas hibridisasi dengan cDNA diikuti dengan tindak balas interkalasi dengan molekul AQMS. Rangsangan DPV biosensor DNA didapati menurun dengan ketara apabila SiNPs yang dimuatkan pada permukaan elektrod melebihi 12.0×10^{-3} mg kerana kadar pemindahan elektron dihadkan oleh amaun SiNPs berlebihan yang tidak konduktif pada permukaan elektrod. Untuk kesan muatan prob DNA, rangsangan biosensor DNA meningkat secara progresif apabila kepekatan prob DNA meningkat daripada 0.5-3.0 μ M (Rajah S1c), disebabkan peningkatan kadar hibridisasi DNA dan kadar tindak balas interkalasi AQMS yang berlaku pada permukaan elektrod. Rangsangan biosensor DNA mula mendatar apabila kepekatan prob DNA dimuatkan melebihi 3 μ M. Ini disebabkan oleh ketepuan permukaan elektrod dengan molekul prob DNA (Nadiah et al. 2024). Suhu adalah satu lagi parameter yang boleh menjejaskan proses hibridisasi DNA. Seperti yang dapat dilihat dalam Rajah S1d, rangsangan biosensor DNA meningkat secara mendadak dengan peningkatan suhu daripada 16 $^{\circ}$ C sehingga 25 $^{\circ}$ C, yang menunjukkan peningkatan suhu inkubasi biosensor DNA menggalakkan peningkatan kadar



RAJAH 1. Rangsangan voltametrik elektrokimia biokonjugat SiNPs-prob DNA terpegun. Voltamogram denyutan pembezaan bagi penunjuk redoks AQMS 1 mM pada SPCE, SPCE terubah suai AuNPs, Si-Au-SPCE dan prob DNA terpegun Si-Au-SPCE sebelum dan selepas penghibridan dengan cDNA dan ncDNA dalam larutan penimbal K-fosfat 0.05 M pada pH7.0

tindak balas hibridisasi DNA. Rangsangan DPV biosensor DNA kemudiannya merosot secara mendadak daripada suhu 40 °C dan ke atas disebabkan oleh proses denaturasi kepada struktur heliks berganda DNA (Jeremy Jason et al. 2024).

Profil masa pemegunan prob DNA, tempoh hibridisasi DNA, pH penimbal, kapasiti penimbal dan kekuatan ion biosensor DNA *E. coli* voltametrik yang dibangunkan berasaskan SPCE nanokomposit Si-Au ditunjukkan dalam Rajah S2. Rangsangan biosensor DNA meningkat secara beransur-ansur dengan peningkatan tempoh pemegunan prob DNA daripada 1.0-5.0 jam (Rajah S2a), yang menunjukkan peningkatan bilangan prob DNA terikat pada permukaan elektrod nano zarah emas berubah suai dengan SiNPs dengan kumpulan berfungsi amina. Rangsangan biosensor DNA elektrokimia mendarat selepas tempoh pemegunan prob DNA selama 5.0 jam disebabkan permukaan SiNPs telah diikatkan sepenuhnya dengan molekul prob DNA melalui taut-silang kovalen dengan glutaraldehid. Biosensor DNA menunjukkan corak rangsangan elektrokimia yang sama untuk kajian masa hibridisasi DNA dengan tindak balas hibridisasi DNA optimum dicapai pada 30 minit (Rajah S2b). Kesan pH terhadap tindak balas hibridisasi DNA telah dikaji dalam julat pH operasi biosensor DNA antara pH 5.5 dan pH 8.5 dan pH hibridisasi DNA optimum diperoleh pada pH 6.5 (Rajah S2c). Tindak balas hibridisasi DNA didapati tidak menggalakkan dalam kedua-dua keadaan pH yang sangat berasid dan beralkali kerana molekul DNA lebih mudah terdedah kepada kesan denaturasi melalui proses protonasi dan deprotonasi masing-masing pada tulang belakang gula-fosfat DNA (Nur Diyana et al. 2023). Ini mengurangkan kestabilan molekul DNA dan rangsangan DPV AQMS yang lebih rendah diperoleh. Kapasiti penimbal dan kekuatan ion adalah parameter yang penting untuk memastikan tindak balas hibridisasi DNA yang optimum. Seperti yang ditunjukkan oleh Rajah S2d dan Rajah S2e, larutan penimbal Na-fosfat 0.05 M diperhatikan sebagai penimbal penghibridan DNA yang optimum dengan kekuatan ion yang sesuai menggunakan ion Na^+ pada kepekatan 0.1 M untuk kadar tindak balas maksimum penghibridan DNA. Ion Na^+ kation diperlukan dalam larutan penimbal hibridisasi DNA untuk meneutralkan ikatan fosfodiester DNA bercas negatif (Eka et al. 2022; Raja Zaidatul Akhmar et al. 2020; Zheng et al. 2024) dan memudahkan tindak balas hibridisasi dengan DNA sasaran. Walau bagaimanapun, kandungan ion Na^+ yang berlebihan iaitu pada kepekatan melebihi 1.0 M didapati telah menurunkan kadar tindak balas hibridisasi DNA secara perlahan.

PRESTASI ANALISIS BIOSENSOR DNA ELEKTROKIMIA BERASASKAN NANOKOMPOSIT Si-Au

Rangsangan voltametrik biosensor DNA terhadap pelbagai kepekatan cDNA *E. coli* O157:H7 ditunjukkan dalam Rajah 2. Rangsangan DPV biosensor DNA elektrokimia meningkat secara linear dengan peningkatan kepekatan

cDNA daripada 1.0×10^{-16} M hingga 1.0×10^{-9} M kerana terdapat semakin banyak beban tunggal cDNA yang dimuatkan ke permukaan elektrod Si-Au-SPCE terpegun dengan prob DNA lalu menggalakkan tindak balas penghibridan DNA dan kadar tindak balas interkalasi AQMS yang lebih tinggi. Had pengesanan biosensor DNA yang dicadangkan dianggarkan pada 1.3×10^{-17} M (0.13 aM). Biosensor DNA berasaskan elektrod nanokomposit Si-Au menunjukkan kepekaan yang tinggi terhadap pengesanan DNA *E. coli* dan ia mampu mengukur kepekatan rendah cDNA secara kuantitatif sehingga ke paras atomolar disebabkan sifat fizikal SiNPs yang tersebar mono dan bioserasi sebagai matriks penyokong DNA.

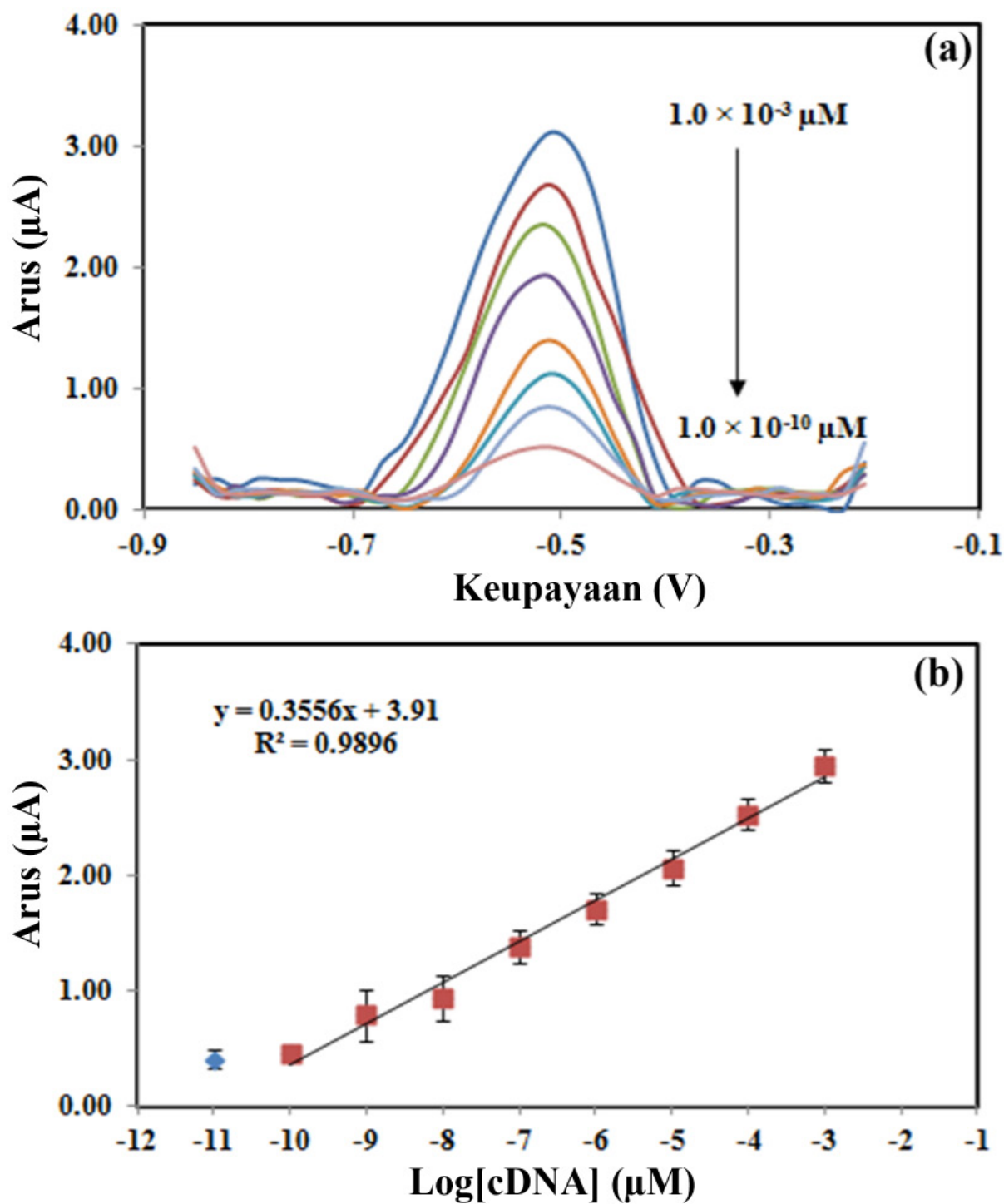
Hasil kajian kepilihan biosensor DNA *E. coli* elektrokimia terhadap pengesanan cDNA, 1-bDNA dan ncDNA pada 5 μM dan 0.5 μM dijadualkan dalam Jadual S2. Penghibridan prob DNA terpegun dengan 1-bDNA didapati menghasilkan ~30% pengurangan rangsangan biosensor DNA berbanding dengan rangsangan DPV biosensor DNA dengan cDNA. Ini menunjukkan bahawa biosensor DNA voltametrik elektrokimia yang dicadangkan adalah amat sensitif kerana ia boleh mendiskriminasi ketidakpadanan walaupun pada pasangan bes tunggal. Rangsangan voltametrik biosensor DNA terhadap ncDNA boleh diabaikan kerana terdapat kurang 5.0% daripada isyarat DPV yang boleh dikesan berbanding dengan rangsangan biosensor DNA yang diperoleh dengan cDNA.

Biosensor DNA yang dicadangkan menunjukkan ciri elektrokimia yang baik dan prestasi analisis yang tinggi dari segi had pengesanan (LOD), masa hibridisasi DNA dan julat rangsangan linear berbanding dengan beberapa biosensor DNA *E. coli* elektrokimia lain yang dilaporkan sebelum ini berasaskan pelbagai reka bentuk biosensor. Biosensor DNA elektrokimia yang dibangunkan dalam kajian ini berasaskan elektrod nanokomposit Si-Au telah menunjukkan masa rangsangan yang lebih singkat, iaitu 30 minit berbanding dengan biosensor lain yang dilaporkan dalam kepustakaan yang boleh mengambil masa analisis sehingga satu jam. Ini disebabkan oleh luas permukaan tinggi SiNPs yang tersebar mono boleh berfungsi sebagai lapisan resapan yang baik pada permukaan elektrod (Jadual S3).

KEBOLEHULANGAN, KEBOLEHASILAN DAN KESTABILAN JANGKA PANJANG

BIOSENSOR DNA *E. coli* ELEKTROKIMIA

Kajian kebolehulangan biosensor DNA *E. coli* elektrokimia yang dijalankan dengan menggunakan 10 elektrod individu yang berbeza dalam penentuan 1.0×10^{-12} M dan 1.0×10^{-9} M cDNA menunjukkan prestasi kebolehulangan yang baik dengan sisihan piawai relatif (RSD, $n=10$) diperoleh antara 2.2% dan 4.3%. Penjanaan semula biosensor DNA selepas penghibridan dengan cDNA pada 1.0×10^{-9} M telah dijalankan menggunakan larutan penjanaan semula NaOH 0.1 M. Larutan NaOH menguraikan struktur heliks



RAJAH 2. Kalibrasi biosensor DNA *E. coli* voltametri elektrokimia. (a) Voltammogram denyutan pembezaan dan (b) lengkung kalibrasi rangsangan biosensor DNA elektrokimia terhadap pelbagai kepekatan cDNA *E. coli* O157:H7 antara $1.0 \times 10^{-16} \text{ M}$ dan $1.0 \times 10^{-9} \text{ M}$

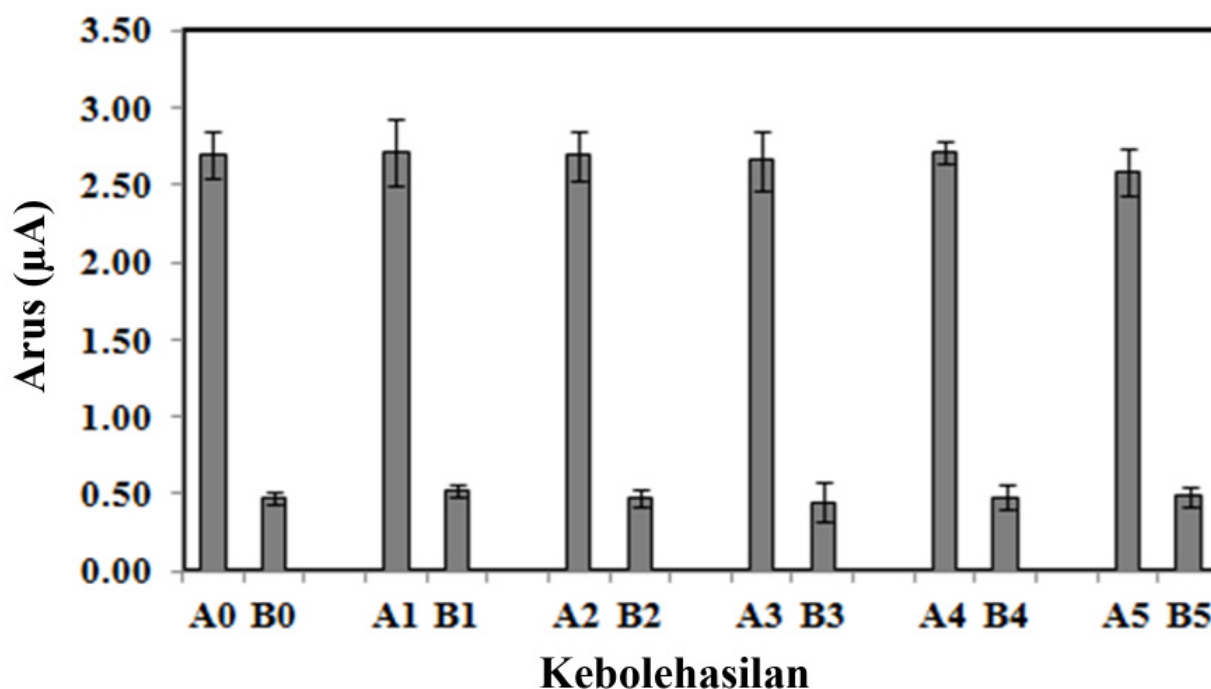
berganda dsDNA terpegun dan menyebabkan penurunan drastik (~10.6-17.5%) pada rangsangan DPV biosensor DNA. Rajah 3 menunjukkan profil kebolehasilan biosensor DNA *E. coli* elektrokimia. Hibridisasi semula biosensor DNA dengan cDNA berikutnya pada kepekatan yang sama dapat mengekalkan rangsangan asalnya dengan RSD kebolehasilan yang memuaskan antara 3.4% dan 5.2% (RSD, $n=6$). Kestabilan jangka panjang biosensor DNA *E. coli* berasaskan elektrod nanokomposit Si-Au selama 120 hari ditunjukkan dalam Rajah S3. Biosensor DNA mengekalkan 85% daripada kestabilan awalnya pada hari ke-60 penyimpanan jangka panjang pada 4 °C dan rangsangan biosensor DNA menurun secara beransur-ansur selepas itu kepada 56-30% antara 80 hari dan 120 hari tempoh penyimpanannya berbanding dengan rangsangan awalnya. Oleh itu, jangka hayat biosensor DNA berasaskan elektrod Si-Au-SPCE adalah selama 2 bulan disebabkan oleh sifat bioserasi yang baik SiNPs sebagai matriks pemegungan DNA.

PENENTUAN KHUSUS JUJUKAN DNA *E. coli* DALAM SAMPEL SAYURAN DAN AIR PERSEKITARAN

Biosensor DNA *E. coli* berasaskan nanokomposit Si-Au yang dibangunkan dalam kajian ini telah digunakan untuk

penentuan kepekatan DNA *E. coli* dalam sampel sayuran mentah dan sampel air daripada sumber yang berbeza seperti air sungai, air laut, air paip dan air mineral. Seperti yang ditunjukkan dalam Jadual S4, kepekatan DNA *E. coli* yang dikesan oleh biosensor DNA dalam sampel sayur kubis (sampel 1, sampel 2 dan sampel 4), air sungai dan air laut adalah berkorelasi dengan hitungan koloni bakteria berdasarkan kaedah pertumbuhan bakteria mikrobiologi sebagai kaedah rujukan ($y=2.9265\ln(x)+2.7862$, $R^2=0.8381$) (Rajah S4).

Untuk sampel sayur kubis 3 dan 5 dalam kedua-dua sampel air paip dan air mineral, bakteria *E. coli* tidak dikesan oleh kaedah pertumbuhan bakteria mikrobiologi dan ini bersetuju dengan kaedah biosensor DNA kerana hanya rangsangan arus asas diperhatikan untuk semua sampel ini. Ini telah membuktikan kejutuan dan kebolehlaksanaan biosensor DNA elektrokimia yang dibangunkan untuk penentuan khusus jujukan DNA secara langsung bagi kepekatan DNA *E. coli* dalam sampel sayuran dan air persekitaran. Tambahan pula, biosensor DNA elektrokimia juga menunjukkan prestasi perolehan semula yang memuaskan dalam julat peratusan perolehan semula 94.0-104.5% untuk kepekatan cDNA *E. coli* yang ditambahkan ke dalam sampel kubis dan sampel air persekitaran (Jadual S5).



RAJAH 3. Profil kebolehasilan biosensor DNA *E. coli* elektrokimia. kebolehasilam biosensor DNA *E. coli* elektrokimia menggunakan larutan penjanaan semula NaOH 0.1 M (15 min) (B) dan penghibridan semula DNA dengan 1.0×10^{-9} M cDNA (30 min) (A)

KESIMPULAN

Biosensor DNA *E. coli* elektrokimia berprestasi tinggi berasaskan nanokomposit Si-Au menunjukkan potensi yang tinggi untuk diaplikasi sebagai alat pengukuran *in-situ* ultrasensitif untuk memantau pencemaran mikrob dalam sampel sayuran dan air persekitaran. SiNPs yang tersebar secara mono membenarkan penyebaran homogen analit pada permukaan elektrod Si-Au-SPCE dan memberikan peningkatan yang ketara kepada prestasi analisis biosensor DNA dari segi had pengesanan, julat rangsangan linear, masa rangsangan, kebolehulangan dan kestabilan jangka panjang biosensor. Biosensor DNA menunjukkan kepilahan ketidakpadanan bes tunggal, peratusan perolehan semula yang tinggi dan pengesanan kepekatan DNA yang rendah pada tahap atomolar membolehkan penentuan khusus jujukan yang tepat bagi kepekatan DNA patogen *E. coli* dalam sayur-sayuran, air persekitaran dan air minuman. Biosensor berasaskan transduser elektrokimia berpotensi untuk diterjemahkan ke dalam penyelesaian digital melalui integrasi dengan internet pelbagai benda (IPB) untuk memanfaatkan ujian lapangan berskala besar.

PENGHARGAAN

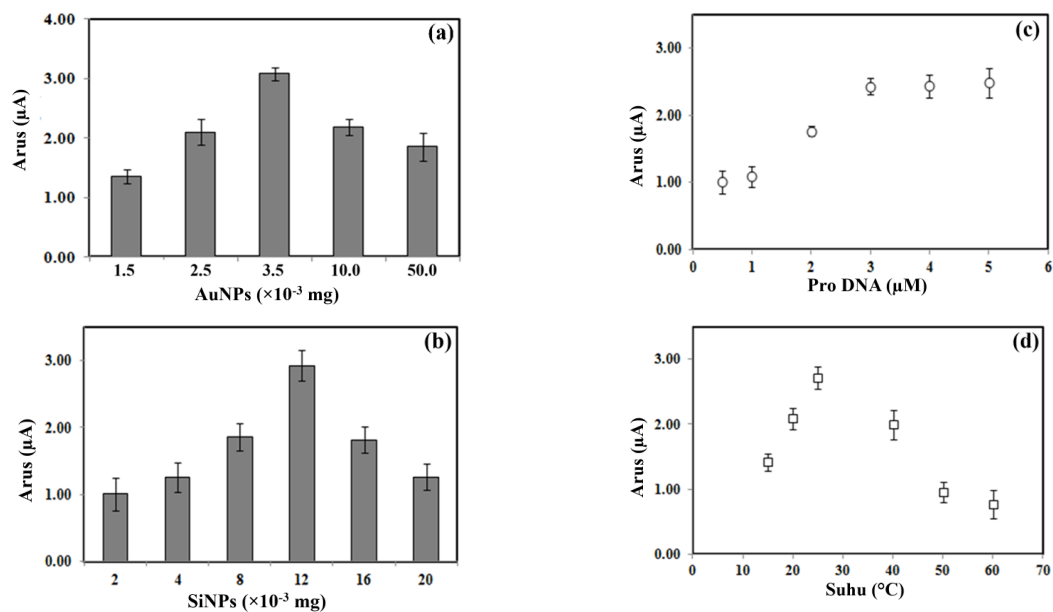
Kami ingin mengucapkan terima kasih kepada Kementerian Sains, Teknologi dan Inovasi Malaysia (MOSTI) yang menyokong kajian ini melalui pembiayaan geran penyelidikan STGL-006-2011 and Universiti Kebangsaan Malaysia (UKM) melalui geran penyelidikan XX-2014-005.

RUJUKAN

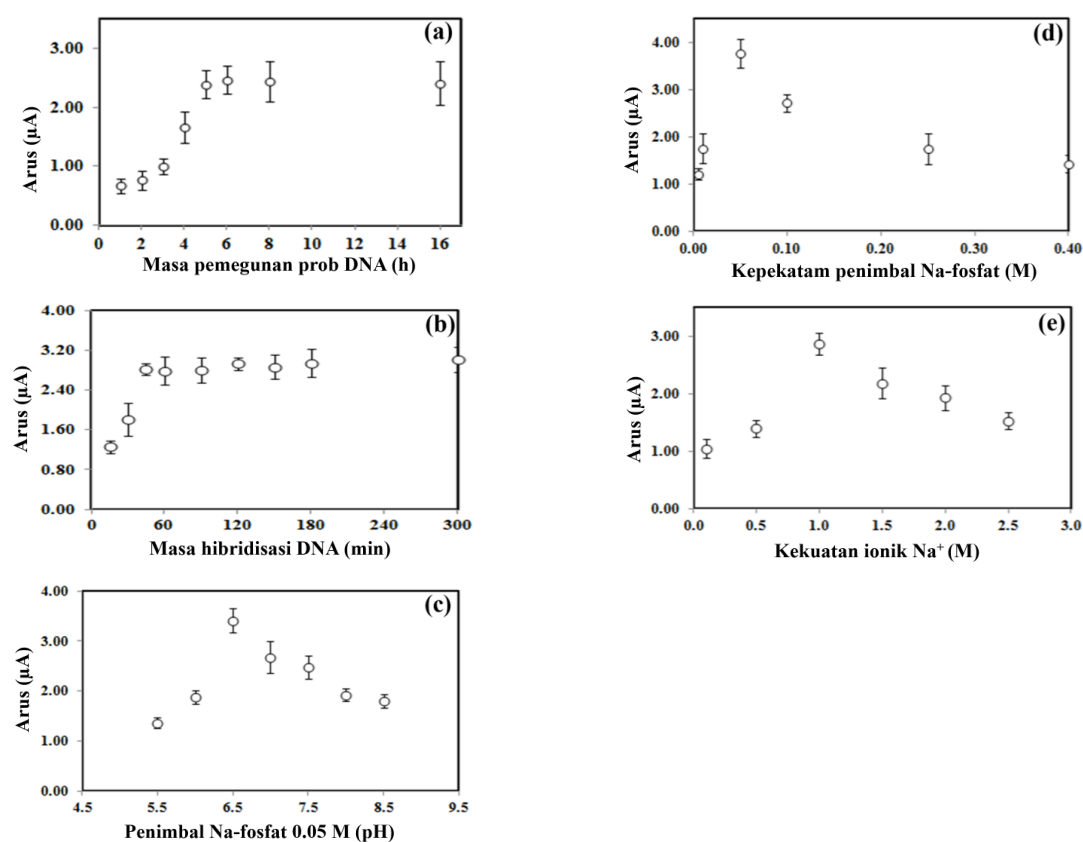
- Bae, S.W., Oh, J., Shin, I., Cho, M.S., Kim, Y., Kim, H. & Hong, J. 2010. Highly sensitive detection of DNA by electrogenerated chemiluminescence amplification using dendritic Ru(bpy)₃²⁺-doped silica nanoparticles. *Analyst* 135: 603-607. doi: <https://doi.org/10.1039/B920998K>
- Bonten, M., Johnson, J.R., Biggelaar, A.H.J., Georgalis, L., Geurtsen, J., Palacios, P.I., Gravenstein, S., Verstraeten, T., Hermans, P. & Poolman, J.T. 2021. Epidemiology of *Escherichia coli* bacteremia: A systematic literature review. *Clinical Infectious Diseases* 72(7): 1211-1219. doi: [10.1093/cid/ciaa210](https://doi.org/10.1093/cid/ciaa210)
- Braz, V.S., Melchior, K. & Moreira, C.G. 2020. *Escherichia coli* as a multifaceted pathogenic and versatile bacterium. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 10: 548492. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.548492>
- Dester, E., Kao, K. & Alocijia, E.C. 2022. Detection of unamplified *E. coli* O157 DNA extracted from large food samples using a gold nanoparticle colorimetric biosensor. *Biosensors* 12(5): 274. <https://doi.org/10.3390/bios12050274>
- Du, Y., Guo, S., Dong, S. & Wang, E. 2011. An integrated sensing system for detection of DNA using new parallel-motif DNA triplex system and grapheme mesoporous silica gold nanoparticle hybrids. *Biomaterials* 32: 8584-8592. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.07.091>
- Eka, S., Lee, Y.H., Musa, A., Tan, L.L., Nazaruddin, N., Khairi, S., Chew, P.C. & Muhammad, I. 2022. Electrochemical DNA biosensor based on mercaptopropionic acid-capped ZnS quantum dots for determination of the gender of arowana fish. *Biosensors* 12(8): 650. <https://doi.org/10.3390/bios12080650>
- El-Moghazy, A.Y., Wisuthiphaet, N., Yang, X., Sun, G. & Nitin, N. 2022. Electrochemical biosensor based on genetically engineered bacteriophage T7 for rapid detection of *Escherichia coli* on fresh produce. *Food Control* 135: 108811. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2022.108811>
- Gambushe, S.M., Zishiri, O.T. & Zowalaty, M.E.E. 2022. Review of *Escherichia coli* O157:H7 prevalence, pathogenicity, heavy metal and antimicrobial resistance, African perspective. *Infection and Drug Resistance* 15: 4645-4673. doi: [10.2147/IDR.S365269](https://doi.org/10.2147/IDR.S365269)
- Garrido, A., Chapela, M., Román, B., Fajardo, P., Vieites, J.M. & Cabado, A.G. 2013. In-house validation of a multiplex real-time PCR method for simultaneous detection of *Salmonella* spp., *Escherichia coli* O157 and *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food Microbiology* 164(1): 92-98. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.03.024>
- Geng, P., Zhang, X., Teng, Y., Fu, Y., Xu, L., Xu, M., Jin, L. & Zhang, W. 2011. A DNA sequence-specific electrochemical biosensor based on alginate-coated cobalt magnetic beads for the detection of *E. coli*. *Biosensors and Bioelectronics* 26: 3325-3330. doi: [10.1016/j.bios.2011.01.007](https://doi.org/10.1016/j.bios.2011.01.007)
- Guo, Z., Yang, F., Zhang, L. & Zheng, X. 2013. Electrogenenerated chemiluminescence energy transfer for the label-free detection of DNA. *Sensors & Actuators B: Chemical* 177: 316-321. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2012.10.141>
- Jiang, W.L., Shan, W.Q., Sheng, W.C., Ying, H.Z., Jian, J. & Ping, W. 2008. The *Escherichia coli* O157:H7 DNA detection on a gold nanoparticle-enhanced piezoelectric biosensor. *Chinese Science Bulletin* 53: 1175-1184. doi: [10.1007/s11434-007-0529-x](https://doi.org/10.1007/s11434-007-0529-x)
- Li, K., Lai, Y., Zhang, W. & Jin, L. 2011. Fe₂O₃@Au core/shell nanoparticle-based electrochemical DNA biosensor for *Escherichia coli* detection. *Talanta* 84: 607-613. doi: [10.1016/j.talanta.2010.12.042](https://doi.org/10.1016/j.talanta.2010.12.042)

- Li, M., Yang, H., Ma, C., Zhang, Y., Ge, S., Yu, J. & Yan, M. 2014. A sensitive signal-off aptasensor for adenosine triphosphate based on the quenching of Ru(bpy)₃²⁺-doped silica nanoparticles electrochemiluminescence by ferrocene. *Sensors & Actuators B: Chemical* 191: 377-383. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2013.10.020>
- Li, Y., Deng, L., Deng, C., Nie, Z., Yang, M. & Si, S. 2012. Simple and sensitive aptasensor based on quantum dot-coated silica nanospheres and the gold screen-printed electrode. *Talanta* 99: 637-642. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2012.06.054>
- Lin, X., Mei, Y., He, C., Luo, Y., Yang, M., Kuang, Y., Ma, X., Zhang, H. & Huang, Q. 2021. Electrochemical biosensing interface based on carbon dots-Fe₃O₄ nanomaterial for the determination of *Escherichia coli* O157:H7. *Frontiers in Chemistry* 9: 2021. <https://doi.org/10.3389/fchem.2021.769648>
- Lu, Z. & Breidt, F. 2015. *Escherichia coli* O157:H7 bacteriophage 241 isolated from an industrial cucumber fermentation at high acidity and salinity. *Frontiers in Biology* 6: 67. doi: 10.3389/fmicb.2015.00067
- Mahirah, T., Tan, L.L., Nurul Huda, A.K., Goh, C.T., Lee, Y.H. & Bahariah, K. 2020. Reflectance aptasensor based on metal salphen label for rapid and facile determination of insulin. *Talanta* 207: 120321. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2019.120321>
- Mao, X., Yang, L., Su, X. & Li, Y. 2006. A nanoparticle amplification based quartz crystal microbalance DNA sensor for detection of *Escherichia coli* O157:H7. *Biosensors and Bioelectronics* 21: 1178-1185. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2005.04.021>
- Nguyen, S.H., Vu, P.L.T. & Tran, M.T. 2023. Absorbance biosensors-based hybrid MoS₂ nanosheets for *Escherichia coli* detection. *Scientific Reports* 13: 10235. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-37395-4>
- Ormsby, M.J., White, H.L., Metcalf, R., Oliver, D.M. & Quilliam, R.S. 2023. Clinically important *E. coli* strains can persist, and retain their pathogenicity, on environmental plastic and fabric waste. *Environmental Pollution* 326: 121466. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2023.121466>
- Osińska, A., Korzeniewska, E., Korzeniowska-Kowal, A., Wzorek, A., Harnisz, M., Jachimowicz, P., Buta- Hubeny, M. & Zieliński, W. 2023. The challenges in the identification of *Escherichia coli* from environmental samples and their genetic characterization. *Environmental Science and Pollution Research* 30: 11572-11583. <https://doi.org/10.1007/s11356-022-22870-8>
- Pandey, C.M., Singh, R., Sumana, G., Pandey, M.K. & Malhotra, B.D. 2011. Electrochemical genosensor based on modified octadecanethiol self-assembled monolayer for *Escherichia coli* detection. *Sensors & Actuators B: Chemical* 151: 333-340. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2010.07.046>
- Petersen, F. & Hubbart, J.A. 2020. Physical factors impacting the survival and occurrence of *Escherichia coli* in secondary habitats. *Water* 12(6): 1796. <https://doi.org/10.3390/w12061796>
- Rahimi, E., Momtaz, H., Anari, M.M.H., Alimoradi, M., Momeni, M. & Riahi, M. 2012. Isolation and genomic characterization of *Escherichia coli* O157:NM and *Escherichia coli* O157:H7 in minced meat and some traditional dairy products in Iran. *African Journal of Biotechnology* 9: 2328-2332. doi: 10.5897/AJB11.2167
- Raja Zaidatul Akhmar, R.J., Tan, L.L., Chong, K.F. & Lee, Y.H. 2020. An electrochemical DNA biosensor from graphene decorated with graphitic nanospheres. *Nanotechnology* 31: 485501. <https://doi.org/10.1088/1361-6528/abab2e>
- Razmi, N., Hasanzadeh, M., Willander, M. & Nur, O. 2020. Recent progress on the electrochemical biosensing of *Escherichia coli* O157:H7: Material and methods overview. *Biosensors* 10(5): 54. doi: 10.3390/bios10050054
- Riva, F., Riva, V., Eckert, E.M., Colinas, N., Cesare, A.D., Borin, S., Mapelli, F. & Crotti, E. 2020. An environmental *Escherichia coli* strain is naturally competent to acquire exogenous DNA. *Frontiers in Microbiology* 11: 574301. doi: 10.3389/fmicb.2020.574301
- Stokes, D.L., Griffin, G.D. & Vo-Dinh, T. 2001. Detection of *E. coli* using a microfluidics-based antibody biochip detection system. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry* 369: 295-301. doi: 10.1007/s002160000660
- Tang, J., Tang, D.P., Su, B.L., Li, Q.F., Qiu, B. & Chen, G.N. 2011. Nanosilver-penetrated polyion graphene complex membrane for mediator-free amperometric immunoassay of alpha-fetoprotein using nanosilver-coated silica nanoparticles. *Electrochimica Acta* 56: 3773-3780. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2011.02.059>
- Zheng, D., Zhang, R., Chen, J., Feng, Z. & Lin, S. 2024. A highly sensitivity electrochemistry biosensor for *E. coli* DNA detection based on hollow and porous dCuO@rGO composite. *Inorganic Chemistry Communications* 166: 112621. <https://doi.org/10.1016/j.inoche.2024.112621>

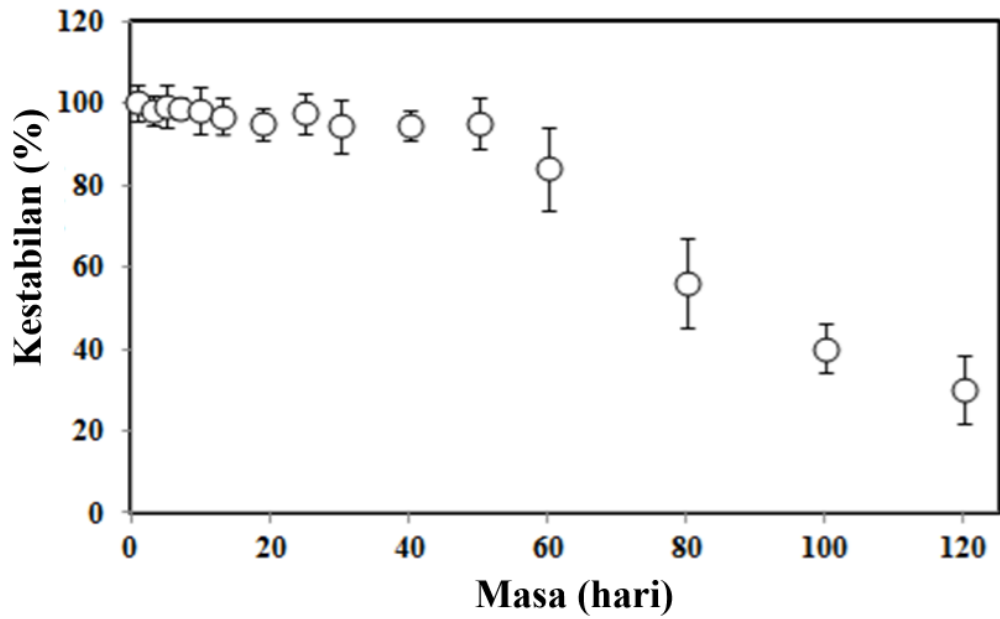
*Pengarang untuk surat-menyurat; email: dedifutra@lecturer.unri.ac.id



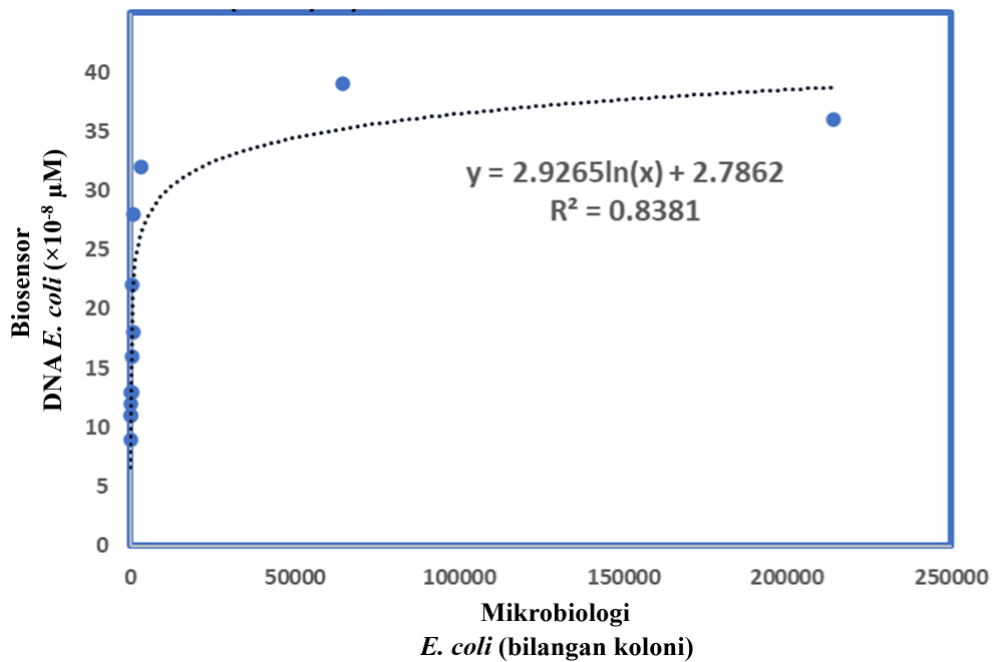
RAJAH S1. Pengoptimuman rangsangan biosensor DNA *E. coli* elektrokimia. Kesan (a) muatan AuNPs, (b) SiNPs dan (c) prob DNA serta (d) suhu pada rangsangan biosensor DNA elektrokimia dengan kehadiran interkalator redoks antrakuinona 1 mM



RAJAH S2. Kajian pengoptimuman hibridisasi DNA elektrokimia. Kesan (a) masa pemegungan prob DNA, (b) masa hibridisasi DNA, (c) pH penimbal Na-fosfat, (d) kapasiti penimbal Na-fosfat dan (e) kekuatan ion Na^+ terhadap rangsangan DPV biosensor DNA berdasarkan penunjuk redoks antrakuinona 1 mM



RAJAH S3. Profil kestabilan jangka panjang biosensor DNA *E. coli* elektrokimia. Rangsangan biosensor DNA *E. coli* terhadap pengesanan 1.0×10^{-10} M cDNA dalam tempoh operasi selama 120 hari



RAJAH S4. Korelasi biosensor DNA *E. coli* dengan hitungan bakteria *E. coli*. Hubungan antara kepekatan DNA *E. coli* yang diukur oleh biosensor DNA dengan bilangan koloni *E. coli* yang dihitung menggunakan kaedah mikrobiologi untuk semua sampel persekitaran yang diuji positif

JADUAL S1. Senarai jujukan oligonukleotida yang digunakan dalam kajian ini

DNA	Jujukan bes
Prob DNA berkumpulan berfungsi amina	5'-GGT CCG CTT GCT CTC GC-3' (AmC3)
cDNA	5'-GCG AGA GCA AGC GGA CC-3'
ncDNA	5'-CTA GTC GTA TAG TAG GC-3'
1-bDNA	5'-GCG AGA GAA AGC GGA CC-3'

JADUAL S2. Prestasi kepilhan biosensor DNA *E. coli* voltametrik elektrokimia terhadap cDNA, 1-bDNA dan ncDNA menggunakan penunjuk hibridisasi DNA AQMS 1 mM

DNA	Kepekatan DNA (5.0 μ M)		Kepekatan DNA (0.5 μ M)	
	Arus puncak (μ A)	(%)	Arus puncak (μ A)	(%)
cDNA	3.034	100.02	2.228	100.03
1-bDNA	2.061	67.94	1.578	70.84
ncDNA	0.128	4.22	0.102	4.58

JADUAL S3. Perbandingan prestasi analisis biosensor DNA yang dibangunkan berasaskan nanokomposit Si-Au dengan biosensor DNA *E. coli* lain yang dilaporkan dalam literatur menggunakan reka bentuk biosensor yang berbeza

Elemen transduksi elektrod	LOD	Masa hibridisasi	Julat rangsangan linear	Rujukan
Elektrod nanokomposit Si-Au (Si-Au-SPCE)	1.30×10^{-17} M	30 min	1.00×10^{-16} - 1.00×10^{-9} M	Kajian ini
dCuO berongga poros dan rangka nipis dan komposit rGO elektrokimia-GCE	3.89×10^{-16} M	-	1.00×10^{-15} - 3.75×10^{-11} M	Zheng et al. (2024)
Butiran magnetik kobalt terubah suai asid alginat	3.00×10^{-10} M	-	-	Geng et al. (2011)
AuNPs kolorimetrik	2.50 ng μ L ⁻¹	30 min	2.50-10.00 ng μ L ⁻¹	Dester, Kao & Alocijia (2022)
Fe ₂ O ₃ -AuNPs magnetik	1.00×10^{-14} M	4 h	-	Li et al. (2011)
Nano lembaran hibrid MoS ₂ -(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄	2.00×10^{-15} M	-	0.00-11.65 $\times 10^{-15}$ M	Nguyen, Vu & Tran (2023)
Karbon dot-Fe ₃ O ₄	6.88 CFU mL ⁻¹	-	10.00-1.00 $\times 10^8$ CFU mL ⁻¹	Lin et al. (2021)
SWCNT-SPE	-	1 h	1.00-104.00 CFU mL ⁻¹	El-Moghazy et al. (2022)

JADUAL S4. Penentuan kepekatan DNA *E. coli* dalam sampel sayur kubis, air sungai, air paip, air mineral dan air laut menggunakan biosensor DNA berasaskan nanokomposit Si-Au yang dicadangkan dan kaedah pertumbuhan koloni bakteria ($n=4$)

Sampel	Kaedah biosensor (Arus, μA)	Kaedah biosensor (DNA dikesan, μM)	Kaedah mikrobiologi (Koloni <i>E. coli</i> /100 mL)
Air sungai			
Kawalan	0.433 $\pm$ 0.02	ND	ND
1	1.996 $\pm$ 0.13	4.15 $\times 10^{-6}$	22
2	2.086 $\pm$ 0.14	7.43 $\times 10^{-6}$	28
3	2.961 $\pm$ 0.12	2.14 $\times 10^{-3}$	36
4	2.304 $\pm$ 0.16	3.05 $\times 10^{-5}$	32
5	2.776 $\pm$ 0.08	6.46 $\times 10^{-4}$	39
Sayur kubis			
Kawalan	0.421 $\pm$ 0.02	ND	ND
1	1.270 $\pm$ 0.11	3.77 $\times 10^{-8}$	9
2	1.346 $\pm$ 0.02	6.16 $\times 10^{-8}$	11
3	0.434 $\pm$ 0.03	ND	ND
4	1.498 $\pm$ 0.07	1.65 $\times 10^{-7}$	13
5	0.373 $\pm$ 0.03	ND	ND
Air paip			
Kawalan	0.434 $\pm$ 0.03	ND	ND
1	0.451 $\pm$ 0.03	ND	ND
2	0.430 $\pm$ 0.04	ND	ND
Air mineral			
Kawalan	0.421 $\pm$ 0.02	ND	ND
1	0.415 $\pm$ 0.03	ND	ND
2	0.424 $\pm$ 0.04	ND	ND
Air laut			
Kawalan	0.402 $\pm$ 0.02	ND	ND
1	1.663 $\pm$ 0.16	4.79 $\times 10^{-7}$	11
2	1.946 $\pm$ 0.08	3.00 $\times 10^{-6}$	13
3	2.061 $\pm$ 0.11	6.31 $\times 10^{-6}$	18
4	2.018 $\pm$ 0.13	4.76 $\times 10^{-6}$	16
5	1.732 $\pm$ 0.16	7.52 $\times 10^{-7}$	12

ND=tidak dikesan

JADUAL S5. Perolehan semula kepekatan DNA *E. coli* ditambah ke dalam sampel sayur kubis dan sampel air persekitaran oleh biosensor DNA elektrokimia yang dibangunkan ($n=3$)

Sampel	Kepekatan cDNA yang ditambah (μM)	Kepekatan DNA yang dikesan (μM)	Perolehan semula (%)
Air sungai			
3	-	2.14×10^{-3}	-
3	2.0×10^{-3}	4.22×10^{-3}	104.0
4	-	3.05×10^{-5}	-
4	2.0×10^{-3}	2.01×10^{-3}	99.0
5	-	6.46×10^{-4}	-
5	2.0×10^{-3}	2.55×10^{-3}	95.2
Sayur kubis			
1	-	3.77×10^{-8}	-
1	2.0×10^{-4}	1.97×10^{-4}	98.5
2	-	6.16×10^{-8}	-
2	2.0×10^{-4}	1.88×10^{-4}	94.0
4	-	1.65×10^{-7}	-
4	2.0×10^{-4}	2.05×10^{-4}	102.4
Air laut			
2	-	3.00×10^{-6}	-
2	2.0×10^{-4}	2.12×10^{-4}	104.5
3	-	6.31×10^{-6}	-
3	2.0×10^{-4}	1.98×10^{-4}	96.0
4	-	4.76×10^{-6}	-
4	2.0×10^{-4}	1.96×10^{-4}	95.5

Perolehan semula (%) = $(A-B)/C$ dengan A=purata kepekatan DNA ditambah dalam sampel yang dikesan oleh biosensor DNA, B=purata kepekatan DNA dalam sampel asal yang dikesan oleh biosensor dan C=kepekatan DNA sebenar yang ditambah ke dalam sampel (C)