

**PEMBINAAN BIOELEKTROD BERASASKAN ENZIM-ENZIM
ALKALINE FOSFATASE DAN GLUKOSA OKSIDASE UNTUK
PENENTUAN HERBISID – ASID (2, 4-
DIKLOROFENOKSI)ASETIK**

EMILDA SYLVESTER GILL

**DISERTASI YANG DIKEMUKAKAN UNTUK MEMENUHI
SEBAHAGIAN DARIPADA SYARAT MEMPEROLEHI IJAZAH
SARJANA MUDA SAINS DENGAN KEPUJIAN DALAM
BIOTEKNOLOGI**

**PROGRAM BIOTEKNOLOGI
SEKOLAH SAINS DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITI MALAYSIA SABAH**

MAC 2005

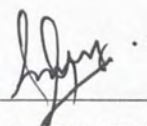


UMS
UNIVERSITI MALAYSIA SABAH

PENGAKUAN

Saya akui karya ini adalah hasil kerja saya sendiri kecuali nukilan dan ringkasan yang setiap satunya telah dijelaskan sumbernya.

31 MAC 2005




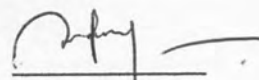
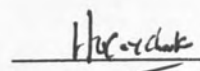
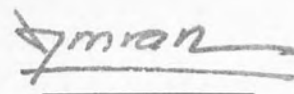
(EMILDA SYLVESTER GILL)

(HS2000-4170)



PENGESAHAN**DIPERAKUKAN OLEH**

Tandatangan

1. PENYELIA**(PROF. DATUK DR. KAMARUZAMAN AMPON)****2. PEMERIKSA 1****(DR. IVY WONG NYET KUI)****3. PEMERIKSA 2****(PROF. DR. HO COY CHOKE)****4. DEKAN****(PROF. MADYA DR. AMRAN AHMED)**

UNIVERSITI MALAYSIA SABAH

BORANG PENGESAHAN STATUS TESIS@

JUDUL: PEMBINAAN BIOELEKTROD BERASASKAN ENZIM-ENZIM ALKALINE
FOSFATASE DAN GLUKOSA OKSIDASE UNTUK PENENTUAN HERBISID-
ASID (2,4-DIKLOROFEENOKSI)ASETIK
Ijazah: SARJANA MUDA SAINS BIOTEKNOLOGI

SESI PENGAJIAN: 2002-2005

Saya EMILDA SYLVESTER GILL

(HURUF BESAR)

mengaku membenarkan tesis (LPS/Sarjana/Doktor Falsafah)* ini disimpan di Perpustakaan Universiti Malaysia Sabah dengan syarat-syarat kegunaan seperti berikut:

1. Tesis adalah hakmilik Universiti Malaysia Sabah.
2. Perpustakaan Universiti Malaysia Sabah dibenarkan membuat salinan untuk tujuan pengajian sahaja.
3. Perpustakaan dibenarkan membuat salinan tesis ini sebagai bahan pertukaran antara institusi pengajian tinggi.
4. **Sila tandakan (/)

SULIT

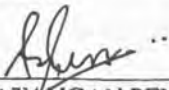
(Mengandungi maklumat yang berdarjah keselamatan atau kepentingan Malaysia seperti yang termaktub di dalam AKTA RAHSIA RASMI 1972)

TERHAD

(Mengandungi maklumat TERHAD yang telah ditentukan oleh organisasi/badan di mana penyelidikan dijalankan)

TIDAK TERHAD

Disahkan oleh



(TANDATANGAN PENULIS)

(TANDATANGAN PUSTAKAWAN)

Alamat Tetap: KG. TAGINAMBUR,
WDT 130, 89159 KOTA
BELUD, SABAH.

PROF. DATUK DR. KAMARUZAMAN AMON
Nama Penyelia

Tarikh: 1 APRIL 2005

Tarikh: 1 APRIL 2005

CATATAN: * Potong yang tidak berkenaan.

** Jika tesis ini SULIT atau TERHAD, sila lampirkan surat daripada pihak berkuasa/organisasi berkenaan dengan menyatakan sekali sebab dan tempoh tesis ini perlu dikelaskan sebagai SULIT dan TERHAD.

@ Tesis dimaksudkan sebagai tesis bagi Ijazah Doktor Falsafah dan Sarjana secara penyelidikan, atau disertasi bagi pengajian secara kerja kursus dan penyelidikan, atau Laporan Projek Sarjana Muda (LPSM).



PENGHARGAAN

Saya amat bersyukur sekali kerana di atas limpah dan kurnia-Nya dapat saya menyiapkan penulisan ilmiah ini. Walaupun terdapat banyak halangan yang terpaksa ditempuhi, namun semua itu tidak menghalang saya daripada menyiapkan laporan projek ini. Dengan kesempatan ini, saya ingin mengucapkan setinggi-tinggi penghargaan dan rasa terima kasih saya kepada Universiti Malaysia Sabah kerana memberi saya peluang serta ruang untuk menimba ilmu pengetahuan dan pengalaman hidup di kampus gemilang ini.

Saya juga ingin mengucapkan jutaan terima kasih buat Prof. Datuk Dr. Kamaruzaman Ampon selaku penyelia projek saya di atas nasihat dan tunjuk ajar yang beliau berikan di sepanjang proses penulisan dan ujikaji. Seterusnya, saya ingin berterima kasih kepada pembantu penyelia iaitu, Encik Chong Tong Seng atas dedikasi dan kerjasama penuh beliau dalam menjayakan projek ini.

Penghargaan turut diberikan kepada semua kakitangan Sekolah Sains dan Teknologi yang secara langsung dan tidak langsung membantu saya dalam menjalankan projek ini. Buat ayah dan ibu serta ahli-ahli keluarga saya, terima kasih di atas kasih sayang dan dorongan yang diberikan serta memahami saya. Akhir sekali, tidak lupa juga rakan-rakan seperjuangan saya yang sentiasa membantu dan berkongsi suka-duka di sepanjang pengajian saya di Universiti Malaysia Sabah.

Sekali lagi saya ucapkan setinggi-tinggi penghargaan kepada semua pihak yang terlibat dalam menjayakan disertasi ini.

Yang Benar,
Emilda Sylvester Gill.



ABSTRAK

Projek ini menerangkan konsep alternatif baru perencatan berasaskan biosensor elektrokimia dalam penentuan kuantitatif asid (2, 4-diklorofenoksi) asetik (2, 4-D). Biosensor ini adalah berdasarkan kombinasi aktiviti katalitik dua enzim; alkaline fosfatase (ALP) dan glukosa oksidase (GOD). Enzim-enzim ALP dan GOD ini dipasangkan kepada elektrod pH suatu set potensiometrik supaya perubahan intensiti arus yang diukur adalah berkadar langsung dengan konsentrasi glukosa-6-fosfat di dalam sampel yang diuji. Penentuan 2, 4-D kemudiannya dilakukan dengan menjalankan pemerhatian rapi ke atas perencatan aktiviti katalitik ALP oleh bioelektrod enzimatik; monoenzim dan bienzim yang di bina dan digunakan. Had rendah pengesanan 2, 4-D yang didapati oleh bioelektrod enzimatik yang digunakan ialah 0.05 ppm. Sesungguhnya, sekiranya kaedah ini terus diguna-pakai dan diperluaskan lagi, biosensor ini sememangnya amat berguna sekali dalam pengesanan pantas dan berterusan herbisid – 2, 4-D.



ABSTRACT

This project describes a novel inhibition-based electrochemical biosensor for the quantitative determination of 2, 4-dichlorophenoxy acetic acid (2, 4-D). The biosensor is based on the combined catalytic activity of two enzymes; alkaline phosphatase (ALP) and glucose oxidase (GOD). The ALP and GOD are coupled to a potentiometric pH electrode so that the current intensity measured is proportional to the concentration of glucose-6-phosphate in a sample. The determination of 2, 4-D is therefore carried out by monitoring the inhibition on the catalytic activity of ALP by the constructed and used enzymatic bioelectrode; monoenzyme and bienzyme. The lower detection limit given by the enzymatic bioelectrode used in this project is as low as 0.05 ppm. Should this method be continued and expanded, the biosensor could be used for the immediate and continuous detection of 2, 4-D in samples.



KANDUNGAN

Muka Surat

| | |
|-------------------|-----|
| PENGAKUAN | ii |
| PENGESAHAN | iii |
| PENGHARGAAN | iv |
| ABSTRAK | v |
| ABSTRACT | vi |
| SENARAI KANDUNGAN | vii |
| SENARAI JADUAL | xi |
| SENARAI ILUSTRASI | xiv |
| SENARAI SIMBOL | xvi |

BAB 1 PENDAHULUAN

| | |
|--|---|
| 1.1 PENGENALAN | 1 |
| 1.1.1 Latar Belakang Kajian | |
| 1.2 OBJEKTIF KAJIAN | 4 |
| 1.3 KEPENTINGAN KAJIAN | 5 |
| 1.4 PENGAPLIKASIAN KAJIAN DALAM BIOTEKNOLOGI | 5 |

BAB 2 KAJIAN DAN ULASAN LITERATUR

| | |
|--|----|
| 2.1 PENGENALAN KEPADA BIOSENSOR | 7 |
| 2.1.1 Sejarah Perkembangan Biosensor | 11 |
| 2.1.2 Jenis-jenis Biosensor | 15 |
| 2.2 JUSTIFIKASI HASIL KERJA TERDAHULU | 19 |
| 2.2.1 Pendahuluan | |
| 2.2.2 Teknik Yang Digunakan Untuk Mengesan Pestisid | |
| 2.3 BIOSENSOR UNTUK PENGAWALAN ALAM SEKITAR | 27 |
| 2.3.1 Alkaline Fosfatase, ALP | 29 |
| 2.3.2 Glukosa Oksidase, GOD | 30 |



| | |
|--|----|
| 2.3.3 Asid (2, 4-diklorofenoksi)asetik, 2, 4-D | 31 |
| A.Penggunaan 2, 4-D Dan Kesannya Dalam Alam Sekitar | 32 |
| B.Penentuan 2, 4-D | 33 |
| | |
| BAB 3 BAHAN DAN KAEDAH | |
| 3.1 BAHAN DAN ALATAN | 35 |
| 3.2 FAKTOR YANG MEMPENGARUHI AKTIVITI ENZIM BEBAS GLUKOSA OKSIDASE | 37 |
| 3.3 FAKTOR YANG MEMPENGARUHI AKTIVITI ENZIM BEBAS ALKALINE FOSFATASE | 41 |
| 3.4 ASAI AKTIVITI ENZIM BEBAS ALKALINE FOSFATASE-GLUKOSA OKSIDASE DAN SENSOR ALKALINE FOSFATASE-GLUKOSA OKSIDASE/BIOELEKTROD BIENZIMATIK | 44 |
| 3.5 KAEDAH PENYEDIAAN SENSOR/BIOELEKTROD HERBISID; ASID (2, 4-DIKLOROFENOKSI)ASETIK | 46 |
| 3.6 KAEDAH PENYEDIAAN SENSOR/BIOELEKTROD MONOENZIMATIK DAN BIENZIMATIK | 48 |
| 3.7 PENGUKURAN POTENSIOMETRIK | 53 |
| | |
| BAB 4 KEPUTUSAN DAN ANALISIS DATA | |
| 4.1 KESAN PH TERHADAP AKTIVITI ENZIM BEBAS GLUKOSA OKSIDASE | 60 |
| 4.2 KESAN KEPEKATAN ENZIM TERHADAP AKTIVITI ENZIM BEBAS GLUKOSA OKSIDASE | 61 |
| 4.3 KESAN KEPEKATAN SUBSTRAT TERHADAP AKTIVITI ENZIM BEBAS GLUKOSA OKSIDASE | 63 |
| 4.4 KADAR AKTIVITI SENSOR GLUKOSA OKSIDASE (ENZIM DISEKAT-GERAK)/BIOELEKTROD MONOENZIMATIK | 65 |
| 4.5 KESAN PH TERHADAP AKTIVITI ENZIM BEBAS ALKALINE FOSFATASE | 67 |



| | | |
|------|--|----|
| 4.6 | KESAN KEPEKATAN ENZIM TERHADAP AKTIVITI ENZIM BEBAS ALKALINE FOSFATASE | 68 |
| 4.7 | KESAN KEPEKATAN SUBSTRAT TERHADAP AKTIVITI ENZIM BEBAS ALKALINE FOSFATASE | 70 |
| 4.8 | PERBANDINGAN KADAR AKTIVITI ENZIM BEBAS ALKALINE FOSFATASE-GLUKOSA OKSIDASE DENGAN BIOELEKTROD BIENZIMATIK/SENSOR ALKALINE FOSFATASE-GLUKOSA OKSIDASE | 72 |
| 4.9 | PARAMETER-PARAMETER BAGI ASAI OLEH BIOELEKTROD-BIOELEKTROD MONOENZIMATIK DAN BIENZIMATIK | 75 |
| 4.10 | PERBANDINGAN ASAI AKTIVITI SENSOR GOD/BIOELEKTROD MONOENZIMATIK BERSAMA ALKALINE FOSFATASE BEBAS DALAM LARUTAN DENGAN/TANPA KEHADIRAN PERENCAT 2, 4-D | 76 |
| 4.11 | PERBANDINGAN ASAI AKTIVITI SENSOR ALP-GOD/BIOELEKTROD BIENZIMATIK DENGAN/TANPA KEHADIRAN PERENCAT 2, 4-D | 78 |
| 4.12 | ASAI AKTIVITI ENZIM OLEH BIOELEKTROD-BIOELEKTROD MONOENZIMATIK DAN BIENZIMATIK (PERENCAT 2, 4-D) | 81 |
| 4.13 | ASAI AKTIVITI ENZIM OLEH BIOELEKTROD-BIOELEKTROD MONOENZIMATIK DAN BIENZIMATIK (PERENCAT KOMERSIL GA-H) | 85 |
| 4.14 | PERBANDINGAN KESAN TINDAKAN 2, 4-D KE ATAS AKTIVITI KATALITIK ASID FOSFATASE (ACP) DAN ALKALINE FOSFATASE OLEH SENSOR GOD/BIOELEKTROD MONOENZIMATIK DENGAN ENZIM BEBAS ACP/ALP DALAM LARUTAN | 88 |
| 4.15 | KADAR PERENCATAN TERHADAP MASA INKUBASI OLEH BIOELEKTROD-BIOELEKTROD MONOENZIMATIK DAN BIENZIMATIK DALAM KONSENTRASI 2, 4-D YANG DIKETAHUI | 90 |
| 4.16 | KADAR PERENCATAN TERHADAP MASA INKUBASI OLEH BIOELEKTROD-BIOELEKTROD MONOENZIMATIK DAN BIENZIMATIK DALAM KONSENTRASI GA-H YANG DIKETAHUI | 93 |
| 4.17 | VARIASI KEUPAYAAN BIOELEKTROD BIENZIMATIK TERHADAP MASA | 96 |



| | |
|---|-----|
| 4.18 CIRI-CIRI ELEKTROANALITIKAL BIOELEKTROD ENZIM YANG DIBINA | 99 |
| BAB 5 PERBINCANGAN DAN KESIMPULAN | 100 |
| RUJUKAN | 108 |
| LAMPIRAN | 112 |



SENARAI JADUAL

| No. Jadual | Muka Surat |
|--|------------|
| 3.1: Komposisi reagen-reagen yang disediakan bagi ujikaji kesan pH terhadap aktiviti glukosa oksidase. | 37 |
| 3.2: Komponen bikar bagi ujikaji kesan kepekatan enzim glukosa oksidase dalam tindakbalas. | 38 |
| 3.3: Komposisi bikar bagi ujikaji kesan kepekatan substrat terhadap aktiviti glukosa oksidase. | 39 |
| 3.4: Komposisi bikar bagi asai aktiviti sensor glukosa oksidase. | 40 |
| 3.5: Komposisi reagen-reagen yang disediakan bagi ujikaji kesan pH terhadap aktiviti alkaline fosfatase. | 41 |
| 3.6: Komponen bikar bagi ujikaji kesan kepekatan enzim alkaline fosfatase dalam tindakbalas. | 42 |
| 3.7: Komposisi bikar bagi ujikaji kesan kepekatan substrat terhadap aktiviti alkaline fosfatase. | 43 |
| 3.8: Komposisi bikar bagi asai aktiviti ALP-GOD bebas. | 44 |
| 3.9: Komposisi bikar bagi asai aktiviti sensor ALP-GOD. | 45 |
| 3.10: Komposisi bikar bagi asai enzim bebas ALP dalam larutan. | 54 |
| 3.11: Komponen bikar bagi asai bioelektrod bienzimatik. | 56 |
| 3.12: Komposisi bikar bagi asai enzim bebas ALP dalam larutan. | 57 |
| 3.13: Komponen bikar bagi asai bioelektrod bienzimatik. | 59 |
| 4.1: Data bagi kesan pH ke atas asai aktiviti enzim bebas GOD dalam larutan. | 60 |
| 4.2: Data-data bagi kesan kepekatan enzim ke atas asai aktiviti enzim bebas GOD dalam larutan. | 62 |
| 4.3: Keputusan kesan kepekatan substrat terhadap aktiviti enzim bagi asai GOD. | 63 |
| 4.4: Nilai $1/V$ dan $1/S$ untuk plot Lineweaver-Burk bagi asai GOD bebas. | 64 |
| 4.5: Keputusan kadar aktiviti enzim bagi asai sensor GOD/bioelektrod monoenzimatik. | 65 |
| 4.6: Data bagi kesan pH ke atas asai aktiviti enzim bebas ALP dalam larutan. | 67 |
| 4.7: Data-data bagi kesan kepekatan enzim ke atas asai aktiviti enzim bebas ALP dalam larutan. | 69 |



| | |
|---|----|
| 4.8: Keputusan kesan kepekatan substrat terhadap aktiviti enzim bebas ALP. | 70 |
| 4.9: Nilai $1/V$ dan $1/S$ untuk plot Lineweaver-Burk bagi asai ALP bebas. | 71 |
| 4.10: Keputusan kadar aktiviti enzim bagi asai bebas ALP-GOD. | 72 |
| 4.11: Keputusan kadar aktiviti sensor ALP-GOD/bioelektrod bienzimatik. | 74 |
| 4.12: Data bagi asai enzim ALP bebas dalam larutan tanpa penambahan perencat oleh bioelektrod monoenzimatik. | 76 |
| 4.13: Data bagi asai bioelektrod monoenzimatik dengan penambahan perencat 2, 4-D. | 77 |
| 4.14: Data bagi asai aktiviti bioelektrod bienzimatik tanpa penambahan perencat 2, 4-D. | 78 |
| 4.15: Data bagi asai bioelektrod bienzimatik dengan penambahan perencat 2, 4-D. | 79 |
| 4.16: Data-data bagi asai aktiviti enzim oleh sensor GOD/bioelektrod monoenzimatik dengan ALP bebas dalam larutan bersama penambahan perencat 2, 4-D. | 81 |
| 4.17: Data-data bagi asai oleh sensor ALP-GOD/bioelektrod bienzimatik bersama penambahan perencat 2, 4-D. | 82 |
| 4.18: Data-data bagi asai aktiviti enzim oleh sensor GOD/bioelektrod monoenzimatik dengan ALP bebas dalam larutan bersama penambahan perencat GA-H. | 85 |
| 4.19: Data-data bagi asai oleh sensor ALP-GOD/bioelektrod bienzimatik bersama penambahan perencat GA-H. | 86 |
| 4.20: Data-data bagi perbandingan kadar tindakan perencatan 2, 4-D ke atas aktiviti katalitik ACP dan ALP. | 88 |
| 4.21: Data-data kesan masa inkubasi oleh bioelektrod monoenzimatik dalam konsentrasi 2, 4-D yang diketahui. | 90 |
| 4.22: Data-data kesan masa inkubasi oleh bioelektrod bienzimatik dalam konsentrasi 2, 4-D yang diketahui. | 91 |
| 4.23: Data-data kesan masa inkubasi oleh bioelektrod monoenzimatik dalam konsentrasi GA-H yang diketahui. | 93 |
| 4.24: Data-data kesan masa inkubasi oleh bioelektrod bienzimatik dalam konsentrasi GA-H yang diketahui. | 94 |



- 4.25: Data-data bagi peratusan (%) aktiviti bioelektrod bienzimatik bersama dengan peredaran masa. 96
- 4.26: Ringkasan ciri-ciri elektroanalitikal bioelektrod-bioelektrod monoenzimatik dan bienzimatik yang dibina dan digunakan. 99



SENARAI ILUSTRASI

| No. Rajah | Muka Surat |
|---|------------|
| 1.1 Pembinaan mudah suatu biosensor. | 9 |
| 1.2 Prinsip asas biosensor. | 10 |
| 2.1 Pandangan skematik longitud lapisan-lapisan membran bioelektrod bienzimatik. | 51 |
| 2.2 Rekaan ringkas asas suatu bioelektrod enzimatik. | 52 |
| 4.1 Graf kadar tindakbalas melawan pH bagi asai aktiviti enzim bebas glukosa oksidase. | 61 |
| 4.2 Graf kadar tindakbalas melawan kepekatan enzim bagi asai aktiviti enzim bebas glukosa oksidase. | 62 |
| 4.3 Plot graf kadar tindakbalas melawan kepekatan substrat dan plot Lineweaver-Burk bagi asai aktiviti enzim bebas GOD. | 64 |
| 4.4 Graf kadar tindakbalas melawan kepekatan substrat bagi asai aktiviti sensor GOD/bioelektrod monoenzimatik. | 66 |
| 4.5 Graf kadar tindakbalas melawan pH bagi asai aktiviti enzim bebas alkaline fosfatase. | 68 |
| 4.6 Graf kadar tindakbalas melawan kepekatan enzim bagi asai aktiviti enzim bebas alkaline fosfatase. | 69 |
| 4.7 Plot graf kadar tindakbalas melawan kepekatan substrat dan plot Lineweaver-Burk bagi asai aktiviti enzim bebas ALP. | 71 |
| 4.8 Plot graf kadar tindakbalas melawan kepekatan substrat bagi asai aktiviti enzim bebas ALP-GOD. | 73 |
| 4.9 Graf kadar tindakbalas melawan kepekatan substrat bagi asai aktiviti sensor ALP-GOD/bioelektrod bienzimatik. | 74 |
| 4.10 Graf menunjukkan perbandingan kadar tindakbalas asai aktiviti sensor GOD/bioelektrod monoenzimatik dengan/tanpa kehadiran perencat 2, 4-D. | 77 |
| 4.11 Graf menunjukkan perbandingan kadar tindakbalas asai aktiviti sensor ALP- GOD/bioelektrod bienzimatik dengan/tanpa kehadiran perencat 2, 4-D. | 80 |
| 4.12 Eksperimen representatif menunjukkan kesan perencatan 2, 4-D ke atas aktiviti katalitik alkaline fosfatase. | 83 |



| | |
|--|-----|
| 4.13 Eksperimen representatif menunjukkan kesan perencatan GA-H ke atas aktiviti katalitik alkaline fosfatase. | 87 |
| 4.14 Graf perbandingan kesan tindakan 2, 4-D ke atas aktiviti katalitik enzim-enzim ACP dan ALP. | 89 |
| 4.15 Plot-plot kalibrasi yang didapati oleh bioelektrod monoenzimatik dan bioelektrod bienzimatik dalam konsentrasi 2, 4-D yang diketahui. | 91 |
| 4.16 Plot-plot kalibrasi yang didapati oleh bioelektrod monoenzimatik dan bioelektrod bienzimatik dalam konsentrasi GA-H yang diketahui. | 94 |
| 4.17 Graf variasi keupayaan penggunaan bioelektrod bienzimatik terhadap masa (hari). | 97 |
| A Pembinaan set potensiometrik dalam ujikaji oleh bioelektrod-bioelektrod enzimatik yang digunakan. | 115 |



SENARAI SIMBOL

| | |
|--------------------|--------------------------|
| μm | micrometer |
| μl | mikroliter |
| μg | mikrogram |
| mg | milligram |
| ml | milliliter |
| ng | nanogram |
| cm | sentimeter |
| cm^3 | sentimeter padu |
| M | molar |
| $^{\circ}\text{C}$ | darjah celcius |
| mM | milimolar |
| U | unit enzim |
| g | gram |
| [S] | kepekatan substrat |
| L | liter |
| / | per |
| [] | kepekatan |
| V_0 | kadar permulaan |
| V_{maks} | kadar maksimum enzim |
| K_m | pemalar Michaelis-Menten |
| EC | Enzyme Commission |



BAB 1

PENDAHULUAN

1.1 PENGENALAN

Keupayaan untuk memantau atau mengenalpasti bahan-bahan pencemar di dalam udara, air dan tanah adalah instrumental dalam usaha memahami dan menangani risiko-risiko yang mampu menjejaskan kesihatan manusia dan ekosistem alam sekitar. Kemajuan dan pembangunan dalam sistem-sistem analitikal dan alat-alatan untuk kawalan pencemaran alam sekitar sehingga kini bukan lagi suatu keperluan asing dalam usaha pemantauan dan pemuliharaan ekosistem kita. Serentak dengan itu, berbagai jenis alatan canggih telah direka dan dibina untuk mengatasi masalah pencemaran alam sekitar ini. Wang, (2000) turut menyatakan pendapatnya bahawa dengan penggunaan alatan canggih seperti sensor elektrokimia dan sistem pengesanan, aktiviti pemantauan dan pengkajian agen-agen pencemar utama dapat dilakukan secara langsung dari tapak kajian itu sendiri.

1.1.1 Latar Belakang Kajian

Pembinaan dan pengaplikasian teknik-teknik analitikal terutamanya teknik kromatografik sudah lama berkembang dalam menentukan agen-agen pencemar alam sekitar. Sebagai contoh, kromatografi gas (GC), kromatografi cecair tekanan tinggi (HPLC) dan kromatografi lapisan nipis (TLC) merupakan alat-alat kromatografi yang



cukup sensitif dan tepat (Barcelo, 1993). Walau bagaimanapun, alat-alat tersebut mahal dan tidak pula bersifat mudah alih, maka alat-alat kromatografi tersebut hanya sesuai digunakan di dalam makmal sahaja. Peredaran masa pula memperlihatkan akan gabungan teknik kromatografik-spektrometrik yang dimajukan lagi berasaskan teknik kromatografik. Teknik kromatografik-spektrometrik ini turut sama diaplikasikan dalam pemantauan agen-agen pencemar alam sekitar. Gabungan-gabungan seperti kromatografi cecair tekanan tinggi-spektrometri massa (HPLC-MS) dan juga kromatografi gas-spektrometri massa (GC-MS) merupakan contoh-contoh yang dinyatakan oleh Vadgama dan Crump, (1992) sebagai alatan-alatan canggih. Vadgama dan Crump turut menegaskan bahawa teknik analisis kromatografik-spektrometrik ini secara ekstrimnya amat berkuasa sekali jika dikaji dan dilihat dari segi kesensitifan, keselektifan dan kespesifikannya, kejituan serta penjimatan masa penganalisaannya. Namun demikian, selain daripada mempertimbangkan aspek ekonomi, kedua-dua teknik kromatografik dan kromatografik-spektrometrik ini turut menunjukkan kelemahan yang amat ketara. Teknik-teknik ini memerlukan tenaga mahir untuk mengendalikan atau menjalankan teknik-teknik analisis tersebut di samping ia turut memperlihatkan keperluan untuk menjalankan proses-proses pra-rawatan ke atas sampel yang akan diasai.

Maka, atas sebab-sebab inilah timbul kecenderungan baru ke arah perkembangan dan rekaan yang lebih maju alat-alat analitikal serta kaedah-kaedah sebagai alternatif baru dalam pemantauan alam sekitar. Rekaan-rekaan baru tersebut akan dapat diaplikasikan dalam penyaringan pelbagai bahan-bahan pencemar dalam matriks persekitaran, meminimakan pra-rawatan sampel, mengurangkan kos dan masa penganalisan malah meluaskan lagi kualiti tapak persampelan dan/atau sampel-sampel



per tapak (Wang et al., 1999). Tidak dapat dinafikan lagi bahawa biosensor merupakan satu alternatif baru yang wajar sekali diperkenalkan, tambahan pula pengaplikasian biosensor ini terhadap pemantauan dan penyelidikan alam sekitar telah pun berkembang dengan pesat sejak tahun-tahun kebelakangan ini.

Projek penyelidikan yang akan dijalankan ini akan terlibat dalam pembinaan satu bioelektrod berasaskan bienzim; alkaline fosfatase dan glukosa oksidase bagi melakukan penentuan herbisid – asid (2, 4-diklorofenoksi)asetik. Sistem bioelektrod-bienzim ini adalah satu kaedah elektrokimia yang menggunakan pengukuran potensiometrik untuk mendapatkan data-data yang merangkumi tindakbalas-tindakbalas di antara bioelektrod-bienzim dengan substrat dan perencat yang digunakan. Pendek kata, sistem biosensor yang digunakan di sini iaitu bioelektrod-bienzim adalah suatu biosensor yang berasaskan sifat perencatan (Jaffrezic-Renault, 2001). Projek penyelidikan ini lebih terikat dengan konsep perencatan kerana pembinaan bioelektrod-bienzim mempunyai ciri-ciri yang bersesuaian sebagai suatu perencat. Prinsip utama operasi perencat yang berasaskan biosensor ini adalah berkenaan dengan tindakbalas yang berlaku di antara suatu kimia spesifik dengan suatu agen-agen biologi yakni perencat yang hadir dalam sampel tertentu. Pada masa yang sama biokatalis, contohnya enzim, akan disekat-gerak pada biosensor itu sendiri. Maka, reaksi daripada biosensor itu adalah diandaikan berkadaran dengan tahap penurunan reaksi enzimatik yang berlaku pada permukaan sensor.



1.2 OBJEKTIF KAJIAN

Objektif utama projek penyelidikan ini ialah untuk mendemonstrasikan suatu rekaan dan pembinaan bioelektrod yang menggunakan bienzim; alkaline fosfatase dan glukosa oksidase bagi menentukan herbisid – asid (2, 4-diklorofenoksi)asetik. Bioelektrod-bienzim atau biosensor ini akan menggunakan kaedah elektrokimia-potensiometrik dalam pengukuran julat perencatan aktiviti enzim alkaline fosfatase oleh asid (2, 4-diklorofenoksi)asetik. Maka, untuk mencapai tujuan utama projek ini, objektif penyelidikan yang dapat dinyatakan di sini ialah seperti yang berikut:

- a) Menyediakan membran-membran enzimatik berdasarkan dua kombinasi enzim; alkaline fosfatase dan glukosa oksidase.
- b) Membina sensor bienzimatik dengan meletakkan kedua-dua membran enzimatik yang telah disediakan pada hujung permukaan suatu elektrod pH.
- c) Menentukan dan mengukur asid (2, 4-diklorofenoksi)asetik dengan membuat pemerhatian ke atas rencatan aktiviti katalisis alkaline fosfatase menggunakan sensor bienzimatik tersebut.
- d) Membuat pengukuran potensiometrik dengan menyambungkan biosensor secara langsung kepada alat meter pH.



1.3 KEPENTINGAN KAJIAN

Projek penyelidikan yang akan dijalankan ini secara khususnya berkepentingan sekali dalam mencapai matlamatnya yang utama iaitu memperkenalkan satu kaedah alternatif baru dalam penentuan kontaminasi alam sekitar. Justeru, dibentangkan suatu kaedah perencatan berasaskan pembinaan bioelektrod elektrokimia potensiometrik dalam penentuan kuantitatif asid (2, 4-diklorofenoksi) asetik. Cadangan pembinaan bioelektrod potensiometrik ini adalah berasaskan kombinasi aktiviti katalitik dua enzim yang berbeza, alkaline fosfatase (ALP) dan glukosa oksidase (GOD).

1.4 PENGAPLIKASIAN KAJIAN DALAM BIOTEKNOLOGI

Bidang biosensor merupakan salah satu daripada pelbagai cabang dalam bioteknologi yang mana sudah sekian lama memperlihatkan ciri-ciri pertumbuhan dan perkembangan yang eksponen. Jika dahulu kita masih sibuk membincangkan akan bidang enzimologi namun kini pusat-pusat penyelidikan di seluruh dunia dan banyak lagi syarikat-syarikat perniagaan yang mula memberi perhatian terhadap bidang biosensor ini. Turut terbukti bahawa pada tahun-tahun kebelakangan ini terdapat peningkatan yang mendadak dalam pasaran berkenaan dengan kertas kerja serta paten-paten atau hakcipta alatan-alatan biosensor (Schmid et al., 1987).

Fakta inilah yang menjelaskan kegunaan analog biosensor perencatan dalam alam sekitar yang memberikan kepentingan dalam aktiviti pengawalan dan pemantauan alam sekitar. Penyelidikan yang dilakukan dalam bidang biosensor adalah secara



langsung kepada rekaan dan pembinaan alat-alat yang berkeselektifan dan berkesensitifan tinggi, namun demikian penggunaan biosensor ini tidak semestinya bersifat 'eksklusif' untuk satu-satu bidang sahaja, sebagai contoh, penggunaannya dalam pengawalan alam sekitar (Vadgama dan Crump, 1992). Sesungguhnya, biosensor juga boleh digunakan dalam bidang penganalisaan bahan makanan dan minuman, klinikal dan industri. Pengeluar-pengeluar biosensor melihat pasaran yang semakin luas dan meningkat dalam permintaan penghasilan alat-alat yang dapat mengawal sekaligus mencegah pencemaran alam sekitar. Keadaan ini disebabkan oleh timbulnya kesedaran oleh masyarakat umum terhadap alam sekitar yang semakin tercemar oleh arus pembangunan pesat kini.

Pembangunan biosensor yang menggunakan konsep perencatan ini akan menjadi amat berkuasa sekali dalam penyaringan populasi besar sampel untuk pelbagai jenis agen-agen pencemar (Turner et al., 1987). Pada masa yang sama ia akan memberikan bantuan yang besar dan efektif untuk pengesanan awal kontaminasi-kontaminasi matriks persekitaran.



BAB 2

KAJIAN DAN ULASAN LITERATUR

2.1 PENGENALAN KEPADA BIOSENSOR

Biosensor merupakan suatu alatan analitikal yang terdiri daripada dua komponen utama iaitu bioreseptor dan transduser. Bioreseptor merupakan suatu bahan biologikal yang dapat mengenalpasti analit sasaran (sama ada biologi atau kimia) di dalam larutan mahu pun di atmosfera. Manakala transduser pula adalah suatu komponen fisio-kimia yang bertanggungjawab dalam menukarkan hasil tindakbalas dan pengenalspatian analit sasaran tersebut kepada suatu isyarat yang boleh diukur. Biosensor menggunakan integrasi kedua-dua komponen tersebut untuk membentuk suatu sensor tunggal.

$$\text{Biosensor} = \text{Bioreseptor} + \text{Transduser}$$

Persamaan umum (Du, 2003) suatu konfigurasi biosensor.

Coller III, (2003) dan Yong, (1994) menyatakan bahawa biosensor merupakan alat analitikal yang mengandungi bahan-bahan biologi katalis; contohnya seperti enzim, antibodi, komponen membran, atau keseluruhan hirisan tisu-tisu mamalia atau tumbuhan. Dalam biosensor ini, bahan biologi yang berkenaan biasanya akan disekat-gerak dan disambungkan dengan sistem transduser yang bersesuaian di mana ia akan menukarkan isyarat biokimia kepada suatu isyarat elektrik yang bersifat kuantitatif



RUJUKAN

- Andreas Katerkamp, Bernd Grundig dan Reinhard Renneberg, 2002. *Chemical and Biochemical Sensors*, Hong Kong University of Science and Technology, China (belum terbit).
- Barcelo, D., 1993. *Environmental Analysis: Techniques, Applications and Quality Assurance. Elsevier Science Publishers*, **13**, 149-156.
- Botre, C., Botre, F., Mazzei, F., dan Podesta, E., 2000. Inhibition-based biosensors for the detection of environmental contaminants: Determination of 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid. *Environmental Toxicology and Chemistry* **19** (12), 2876-2881.
- Ciucu, A., Ciucu, C., dan Baldwin, R. P., 2002. Organic phase potentiometric biosensor for detection of pesticides. *Roum. Biotechnology Lett.*, Vol. **7**, No. 2, 625-630.
- Coller III, R. D., 2003. Studies of enzyme inhibition biosensors for applications in natural environments and in vivo. *Abstract 2003 Annual Technical Conference and Leadership Workshop, 11-13 April 2003*, Hyatt Regency, New Orleans, 3.
- Diehl-Faxon, J., Ghindilis, A. L., Atanasov, P. dan Wilkins, E., 1998. *Potentiometric Electrodes for Environmental Monitoring of Organophosphorus Pesticides*. Chemical and Nuclear Engineering Department, University of New Mexico, Albuquerque, NM.
- Du, W., 2003. *State-of-the-art-of-biosensor*. Mechanical and Aerospace Engineering, San José State University (tidak diterbitkan).
- Dzantier, B. B., Zherder, A. V., Yulaer, M. F., Sildikov, R. A., Dmitriera, N. M. dan Moreva, I. Yu., 1996. Electrochemical immunosensor for determination of 2, 4-dichlorophenoxyacetic and 2, 4, 5-trichlorophenoxyacetic acids. *Biosensor and Bioelectronics* **11** (1/2), 179-185.
- Gopel, W. dan Schierbaum, K. D., 1991. *Definitions and typical examples*. Dlm.: Gopel, W., Jones, T. A., Kleitz, M., Lundsstrom, J. dan Seiyama, T. (Eds.), *Sensor – A comprehensive survey*. Chemical and Biochemical Sensors, Vol. 2, VCH, Jerman, 1-28.
- Green, M. J., 1987. New approaches in electrochemical immunoassay. Dlm.: Turner, A. P. F., Karube, I. dan Wilson, G. S. (eds.), *Biosensors, Fundamentals and Applications*, Oxford University Press, 57-65.
- Guibalt, G. G., Kramer, D. N. dan Cannon, P. L., 1962. Electrochemical determination of organophosphorus compounds. *Analytical Chemistry* **34**, 1437-1439.
- Halamek, J., Hepel, M. dan Skaladal, P., 2001. Investigation of highly sensitive piezoelectric immunosensors for 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid. *Biosensors and Bioelectronics* **16**, 253-260.



- Hartmeier, W., 1986. *Immobilized Biocatalysts: An Introduction*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, German, 14.
- Heineman, W. R., dan Halsall, H. B., 1985. Strategies for electrochemical immunoassay. *Analytical Chemistry* **57**, 1321A-1330A.
- Ho, M. Y. K. dan Rechnitz, G. A., 1987. Highly stable biosensor using an artificial enzyme. *Analytical Chemistry* **59**, 536-537.
- Howard, P. P., 1991. *Handbook of Environmental Fate and Exposure Data for Organic Chemicals, Pesticides, Volume III*. Lewis Publishers. Cambridge, UK, 276.
- Jaffrezic-Renault, N., 2001. New trends in biosensors for organophosphorus pesticides. *Sensors* (1), 866-869.
- Janata, J., (1975), An immunoelectrode. *Journal of the American Chemical Society* **97**, 2914-2916.
- Koblizek, M., Masojidek, J., Komenda, J., Kucera, T., Pilloton, R., Mattoo, A. K. dan Giardi, M. T., 1998. A sensitive photosystem-II based biosensor for detection of a class of herbicides. *Biotech. Bioeng* **60** (6), 664-669.
- Lilienfeld, D. E. dan Gallo, M., 1989. 2, 4-D, 2, 4, 5-T and 2, 3, 7, 8-TCDD: An Overview. *Epidemiologic Reviews* **II**, 19-58.
- Mazzei, F., Botre, F. dan Botre, C., 1996. Acid phosphatase/glucose oxidase-based biosensors for the determination of pesticides. *Analytica Chimica Acta* **336**, 67-75.
- Mori, S., Okamoto, M., Nishibori, M., Ichimura, M., Sakiyama, J. dan Endo, H., 1999. Purification and characterization of alkaline phosphatase from *Bacillus stearothermophilus*. *Biotechnology Application in Biochemistry* **29**, 233-239.
- Mulchandani, P., Mulchandani, A., Kaneva, I., dan Chen, W., 1999. Biosensor for direct determination of organophosphate nerve agents. I. Potentiometric enzyme electrode. *Biosensors and Bioelectronics* **14**, Elsevier, 77-85.
- Nwosu, T. N., Palleschi, G., dan Mascini, M., 1992. Comparative studies of immobilized enzyme electrodes based on the inhibitory effect of nicotine on choline oxidase and acetylcholinesterase. *Analytical Letters* **25**, 821-835.
- Oxford-Dictionary of Science*, 1999. 4th Edition. Oxford university Press, Oxford, 92.
- Pearson, J. E., Gill, A., dan Vadgama, P., 2000. Analytical aspects of biosensors. *Analytical Chemical Biochemistry* **37**, 119-145.



- Rizzuto, M., Polcano, C., Desiderion, C. Koblizek, M., Pilloton, R., dan Giardi, M. T., 2000. Herbicide monitoring in surface water samples with a photosystem-II based biosensor. *Proceedings of the II Workshop on Chemical Sensors and Biosensors*, 348-355.
- Rogers, K. R., dan Gerlach, C. L., 1996. *Environmental Biosensors: A Status Report*. Environmental Science and Technology, American Chemical Society (belum terbit).
- Rogers, K. R. dan Williams, L. R., 1995. Biosensors for environmental monitoring: a regulatory perspective. *Trends Analytical Chemistry* 7, 289-294.
- Scheller, F. dan Schmid, R. D., 1992. *Biosensors: Fundamentals, Technologies and Applications*. *GBF Monographs* 17, 189-197.
- Scheller, F. dan Schubert, F., 1992. Biosensors: Techniques and Instrumentation in Analytical Chemistry. *Elsevier Science Publishers* 11, 50-64.
- Schmid, R. D. dan Scheller, F., 1989. Biosensors Applications in Medicine, Environmental Protection and Water Process Control. *GBF Monographs* 13, 221-224.
- Schmid, R. D., Guibalt, G. G., Karube, I., Schmidt, H. L. dan Wingard, L. B., 1987. Biosensors International Workshop 1987. *GBF Monographs* 10, 4.
- Su, Y. S., Cagnini, A. Dan Mascini, M., 1995. Screen-printed biosensor alkaline phosphatase-based for environmental applications. *Chemia. Analityczna* 40, 579-585.
- Trau, D., Theuerl, T., Wilmer, M., Muesel, M., dan Spener, F., 1997. Development of an amperometric flow-injection immunoanalysis system for the determination of the herbicide 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid in water. *Biosensors and Bioelectronics* 11 (1/2), 179-185.
- Turner, A. P. F., Karube, I. dan Wilson, G. S., 1987. *Biosensors: Fundamentals and Applications*. *Oxford University Press*, Oxford, 770.
- Tuxen, N., De Liphany, J.R., Albrechtsen, H-J., Aamand, J. dan Bjerg, P. L., 2000. Effect of exposure history on microbial herbicide degradation in an aerobic aquifer affected by a point source. *Environment Science and Technology* 36, 2205-2212.
- Updike, S. J. dan Hicks, J. P., 1967. The enzyme electrode. *Nature* 214, 986-988.
- Vadgama, P. dan Crump, P. W., 1992. Biosensors – Recent trends – A review. *Analyst* 117, 1657-1670.
- Wang, J., 2000. *Electrochemical sensors for environmental monitoring: A review of recent technology*. New Mexico State University, New Mexico (belum terbit).



- Wang, J., Chen, L., Mulchandani, A., Mulchandani, P. dan Chen, W., 1999. Remote biosensor for in-situ monitoring of organophosphate nerve agents. *Electroanalysis* **11** (12), 866-869.
- Weller, M.G., 2000. Immunochromatographic techniques – a critical review. *Fresenius Journal Analytical Chemistry* **366**, 635-645.
- Yong Chan Yoon, 1994. *Pembentukan alat pengesan racun perosak menggunakan asetilkolinesterase*. Disertasi Bachelor Sains, Universiti Pertanian Malaysia, Serdang (tidak diterbitkan).
- Zhang, S., Wright, G., dan Yang, Y., 2000. Materials and techniques for electrochemical biosensor design and construction. *Biosensors and Bioelectronics* **15**, 273-282.

