

# DETEKSI HIBRIDISASI DALAM BIOSENSOR DNA ELEKTROKIMIA

## 1. Disain Biosensor Hibridisasi Elektrokimia

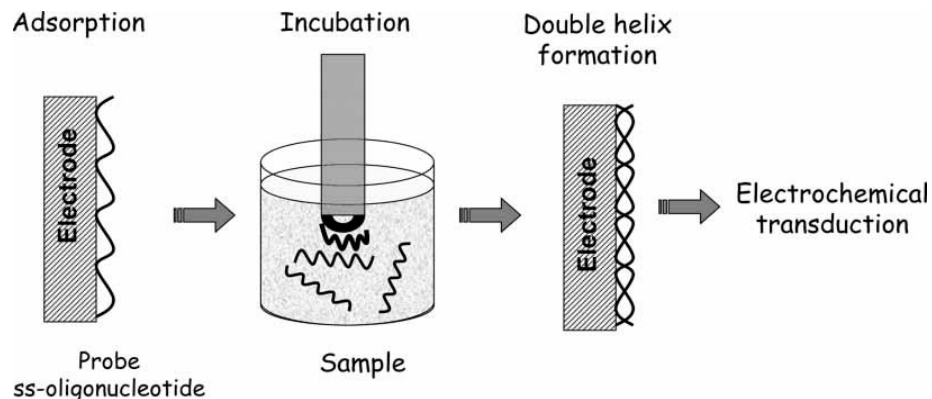
Pemilihan asam nukleat untuk preparasi suatu biosensor berdasarkan DNA terutama bergantung pada apa yang akan di-*sense*. Misalnya jika tujuan biosensor untuk mendeteksi urutan DNA, suatu ssDNA, biasanya oligonukleotida pendek digunakan sebagai elemen *biosensing*. Dendrimer dan analog DNA dapat digunakan juga untuk tujuan ini.

Dua aspek yang penting dalam pengembangan biosensor hibridisasi: sensitivitas untuk mendeteksi konsentrasi DNA yang serendah mungkin, dan selektivitas untuk dapat mendeteksi titik mutasi. Metode tradisional untuk mendeteksi terjadinya hibridisasi adalah sangat lambat dan memerlukan preparasi khusus. Ini yang menjadi alasan mengapa akhir-akhir ini pengembangan biosensor hibridisasi secara elektrokimia menjadi sangat menarik.

Suatu biosensor hibridisasi DNA elektrokimia pada dasarnya terdiri dari suatu elektrode yang dimodifikasi dengan ssDNA yang disebut **probe**. Karena elektrode dimodifikasi dengan probe, maka akan menyebabkan interaksi dengan sampel melalui pengenalan urutan komplementernya, di antara yang lainnya, di bawah kondisi pH, kekuatan ion, dan temperatur tertentu. Tahap selanjutnya adalah deteksi pembentukan *double helix* (Gambar 1).

Tahap-tahap pembuatan biosensor hibridisasi elektrokimia meliputi: amobilisasi probe, hibridisasi dan deteksi terjadinya hibridisasi. Dalam makalah ini akan dikemukakan mengenai deteksi terjadinya hibridisasi dna antara probe dengan target.

DNA diamobilisasi agar basa-basa dapat mengalami biopengenalan selanjutnya dengan urutan komplementernya. Dalam hal ini, sifat elektrode memainkan peranan yang sangat penting. Bagaimana kompromi basa-basa untuk berinteraksi dengan permukaan elektrode dan selanjutnya mereka dapat membentuk *double helix*.



Gambar 1. Skema umum tahapan operasi suatu biosensor hibridisasi DNA secara elektrokimia (Rivas *et al.* 2005).

## **2. Deteksi Terjadinya Hibridisasi**

Kebanyakan strategi untuk deteksi terjadinya hibridisasi adalah berdasarkan: signal redoks asam nukleat yang diamobilisasi pada permukaan elektrode, signal redoks senyawa yang bergabung secara selektif dengan dsDNA, perubahan dalam sifat elektronik dari antarmuka, dan penggunaan skema amplifikasi yang berbeda.

### **2.1 Berdasarkan Signal Redoks Asam Nukleat**

Kelompok Wang (1998c) mengajukan suatu biosensor elektrokimia untuk deteksi DNA *Cryptosporidium parvum* (29-mer oligonukleotida), berdasarkan penggunaan suatu probe oligonukleotida yang mengandung inosin sebagai pengganti guanin. Suatu inosin hipoksantin dapat berinteraksi dengan sitosin meskipun interaksinya lebih lemah dibanding guanin-sitosin, karena mereka dapat membentuk hanya dua ikatan hidrogen. Terjadinya hibridisasi dievaluasi dari signal oksidasi guanin secara kronopotensiometri, signal berasal dari target.

Lucarelli *et al.* (2002) mengajukan skema untuk deteksi urutan DNA hasil amplifikasi PCR yang berkaitan dengan apolipoprotein E (apoE). Mereka menggunakan oligonukleotida 23-mer yang mengandung residu inosin sebagai probe yang diadsorpsi pada SPE. Pembentukan dupleks dideteksi dari signal oksidasi guanin menggunakan SWV. Rasio terbaik antara signal untuk urutan komplementer dan nonkomplementer diperoleh setelah adsorpsi 15 µg/mL urutan probe selama 2 menit pada potensial 0,50V dalam larutan dengan kekuatan ion yang rendah. Untuk waktu yang kurang dari 10 menit mereka melaporkan selektivitas yang sangat baik,

dengan limit deteksi  $2,6 \times 10^{11}$  molekul target dalam larutan sampel 10  $\mu\text{L}$ . Hibridisasi dilakukan pada temperatur ruang selama 10 menit menggunakan larutan hibridisasi 10 mL. Limit deteksi diperoleh 3,0  $\mu\text{g/mL}$  target. Biosensor yang diajukan dapat membedakan dengan jelas antara DNA spesifik untuk apoE dan sampel kontrol negatif, dengan suatu reproduibilitas 14% untuk oligonukleotida target sintesis dan 15-25% untuk sampel sebenarnya. Suatu pengganggu 50% dapat teramati untuk urutan yang mengandung satu basa *mismatch*.

Kelompok Thorp melaporkan beberapa penelitian yang berkaitan dengan efek elektrokatalitik  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$  terhadap oksidasi guanin menggunakan elektrode ITO (Napier dan Thorp 1997a; Aper *et al.* 1997b; Ontko *et al.* 1999; Armistead dan Thorp 2000, 2001; Johnston dan Thorp 1996). Napier *et al.* (1997b) mengajukan suatu biosensor elektrokimia untuk deteksi terjadinya hibridisasi berdasarkan transfer elektron guanin terhadap kompleks logam  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ .

Suatu urutan probe yang mengandung inosin sebagai pengganti guanin telah digunakan sebagai probe (Napier dan Thorp 1997a). Dalam penelitian ini, efisiensi biosensor untuk penentuan produk PCR telah ditunjukkan untuk pertama kalinya menggunakan DNA genomik dari virus *Herpes simplex* tipe II (561 pb), *Clostridium perfringens* (247 bp), dan RNA genomik HIV (3.2 kb), dengan perbedaan yang sangat baik terhadap urutan nonkomplementernya. Napier dan Thorp (1997a) juga menggunakan ITO yang dimodifikasi dengan *1,12-dodecanedicarboxylic acid* (DDCA) dan poli(C) untuk mendeteksi hibridisasinya dengan poli(G). Monolayer DDCA mencegah oksidasi langsung guanin sementara elektroaktivitas tinggi untuk

$\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ . Penentuan dilakukan dalam 50mM bufer fosfat pH 7.0 dari arus katalitik diperoleh setelah penambahan 200mM  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ .

## 2.2. Berdasarkan Penggunaan Indikator Redoks

Kompleks logam dan senyawa organik dapat berinteraksi dengan DNA pada dasarnya berdasarkan dua mode pengikatan, kovalen dan nonkovalen. Dalam mode pengikatan nonkovalen adalah mungkin untuk membedakan interaksi elektrostatik, interkalasi, pengikatan *groove*, dan ikatan hidrogen (Neidle 1994; Lippard dan Berg 1994).

Kriteria pemilihan indikator redoks adalah berdasarkan selektivitas senyawa dengan dsDNA dibandingkan dengan ssDNA. Bahkan jika beberapa senyawa yang hanya berinteraksi *groove* dapat digunakan juga untuk deteksi terjadinya hibridisasi (Hashimoto *et al.* 1994a). Indikator redoks yang paling efisien adalah senyawa-senyawa yang terinterkalasi ke dalam *double helix*.

### 2.2.1 Kompleks Logam

#### 2.2.1.a. Kompleks Osmium.

Ju *et al.* (2003) melaporkan biosensor hibridisasi untuk deteksi fragmen DNA HBV, diamplifikasi PCR menggunakan di(2,2'-bipyridine)osmium (III) ( $[\text{Os}(\text{bpy})_2\text{Cl}_2]^{2+}$ ) sebagai indikator redoks. Penggunaan metodologi ini memungkinkan untuk mendeteksi  $8,3 \times 10^{-21}$  mol DNA HBV genomik asal (dengan voltametri siklik).

Maruyama *et al.* (2001) mempelajari perilaku beberapa kompleks osmium sebagai indikator hibridisasi. Kompleks  $[\text{Os}(5,6\text{-dmphen})_3]_2^+$ , (5,6-dmphen  $\frac{1}{4}$  5,6-dimethyl-1,10-phenantroline) memiliki konstanta pengikatan lebih besar ( $4,2 \times 10^5 \text{M}^{-1}$ ). Dengan keberadaan hibrid pada permukaan elektrode, signal DPV meningkat dari  $3,76 \mu\text{A}$  ke  $18,2 \mu\text{A}$  sementara potensial bergeser dari 600 ke 672 mV. Hibridisasi dilakukan pada  $80^\circ\text{C}$  dalam larutan bufer Tris pH 8,5 yang mengandung 1,0M NaCl diikuti dengan tahap pendinginan perlahan hingga  $37^\circ\text{C}$  dengan pengadukan selama 90 menit. Setelah itu, elektrode yang mengandung hibrid dicelupkan ke dalam larutan 10mM Tris-HCl + 10mM NaCl yang mengandung 5mM kompleks osmium selama 5 menit. Transduksi dilakukan dalam bufer 10mM Tris-HCl pH 7.0 pada  $37^\circ\text{C}$  menggunakan SWV. Respons linier diperoleh dari  $6,9 \times 10^{-10}$  sampai  $6,9 \times 10^{-5} \text{g/mL}$  target.

Liu dan Anzai (2004) memperkenalkan PVP- $[\text{Os}(5,6\text{-dmphen})_2\text{Cl}]_2^{2+}$  sebagai interkalator baru. Senyawa tersebut adalah suatu derivat poli(4-vinilpiridina) yang diturunkan dari kompleks aktif redoks osmium. Probe diperoleh dengan *self-assembly* suatu 5'-mercaptohexyl-tagged ssDNA pada elektrode emas diikuti dengan penguapan menjadi 6-mercapto-1-hexanol. Hibridisasi dilakukan dengan penambahan oligonukleotida komplementer pada ujung elektrode dimodifikasi probe bertiolasi. Setelah 10 menit interaksi dengan indikator redoks (0,1 mM dalam larutan 9:1 air/etanol), deteksi elektrokimia dilakukan dengan CV dan DPV. Responsnya 1000 kali lipat lebih sensitif dibanding yang diperoleh dengan analog monomer, dengan limit deteksi 0.1pM atau 0.5 amol. Biosensor dapat digunakan kembali

setelah dicelupkan dalam bufer Tris-HCl yang mengandung 1mM EDTA pH 8.0 pada temperatur 100°C selama 6 menit.

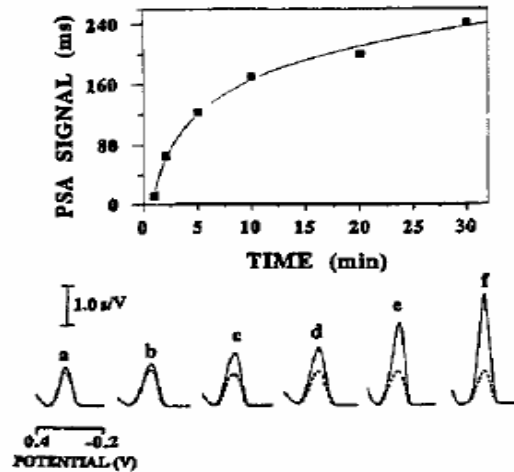
#### **2.2.1.b. Kompleks Kobalt.**

*Tris(2,2-bipyridyl)cobalt (III) perchlorate* dan *tris(1,10-phenantroline)cobalt (III) perchlorate* digunakan oleh kelompok Mikkelsen sebagai indikator redoks (Millan *et al.* 1994). Hibridisasi dilakukan pada temperatur 25°C untuk 50 µL larutan target selama 15 menit pada permukaan elektrode karbon gelas dimodifikasi secara kovalen dengan probe. Kinerja lebih baik diperoleh dengan  $\text{Co}(\text{bpy})_3^{3+}$ . Biosensor dapat digunakan kembali minimal 10 siklus setelah denaturasi *double helix* dengan pemanasan dalam air pada temperatur 100°C selama 10 menit. Wang *et al.* (Wang *et al.* 1996c, 1997 g) melaporkan kegunaan  $\text{Co}(\text{phen})_3^{3+}$  sebagai indikator redoks untuk transduksi proses hibridisasi pada CPE dengan PSA. Mereka mendisain dan mengkarakterisasi beberapa biosensor untuk mendeteksi oligonukleotida sintesis yang berkaitan dengan DNA bakteri dan virus (Wang *et al.* 1996b; 1997d, e; 1999a). Dalam hal DNA HIV (Wang *et al.* 1996b), sensor berdasarkan pada penggunaan oligonukleotida pendek (21-mer atau 42-mer *single stranded* oligonukleotida) dari urutan *long terminal repeat* (LTR) HIV-1 US yang diamobilisasi pada elektrode pasta karbon atau *screen printed*. Hibridisasi dilakukan pada temperatur ruang dengan potensial konstan 0,50V selama 5 menit dalam larutan 0.75M NaCl + bufer fosfat 0,020M pH 7.0. Pengikatan  $\text{Co}(\text{phen})_3^{3+}$  dilakukan dalam larutan bufer Tris-HCl pH 7,00 yang mengandung  $5,0 \times 10^{-5}\text{M}$  indikator selama 1 menit pada 0,50 V.

Transduksi dilakukan dalam larutan bufer Tris menggunakan PSA dengan arus konstan  $-8,0 \mu\text{A}$ . Signal analitik diperoleh dari reduksi  $\text{Co}(\text{phen})_3^{3+}$  pada  $140 \text{ mV}$ .

Gambar 2. menunjukkan pengaruh waktu hibridisasi pada signal kronopotensiometri indikator redoks menggunakan  $5,0 \times 10^{-7} \text{M}$  21-mer DNA HIV-1 sebagai target. Kronopotensiogram dalam garis putus-putus berkaitan dengan signal dari blanko menunjukkan reduksi indikator redoks yang bergabung dengan ssDNA. Kronopotensiogram dalam garis tebal menunjukkan signal yang diperoleh setelah hibridisasi, dan dalam hal ini indikator terakumulasi dalam double helix tidak hanya secara elektrostatik, tetapi juga dengan interkalasi. Signal analitik adalah perbedaan antara dua signal. Signal hibridisasi meningkat pada awalnya, kemudian berhenti hingga kejenuhan molekul probe yang dapat dicapai pada permukaan elektrode. Limit deteksi setelah 30 menit hibridisasi adalah  $4 \times 10^{-9} \text{M}$ . Suatu pendekatan yang mirip dilaporkan untuk deteksi DNA *Mycobacterium tuberculosis* menggunakan 27- dan 36-mer oligonucleotida dengan limit deteksi  $3,4 \times 10^{-9} \text{M}$  (Wang *et al.* 1997d). Untuk DNA *Cryptosporidium parvum* (Wang *et al.* 1997e) hibridisasi dilakukan dalam  $0,5 \text{M NaCl} + 1,0 \text{M guanidin}$ . Limit deteksi dari 100 dan 50 ng/mL diperoleh setelah periode hibridisasi 15 dan 30 menit berturut-turut.  $\text{Co}(\text{phen})_3^{3+}$  juga telah digunakan sebagai indikator redoks untuk deteksi DNA *C. parvum* menggunakan biosensor hibridisasi DNA SPE yang dapat dihaluskan dan dilarutkan dengan limit deteksi dari 20 mg/L target setelah hibridisasi 20 menit (Wang *et al.* 1998a). Erdem *et al.* (1999) mengajukan elektrode pasta karbon yang dimodifikasi dengan 21-mer

oligonukleotida untuk deteksi DNA HBV menggunakan indikator redoks  $\text{Co(phen)}_3^{3+}$ .



Gambar 2. Sensor hibridisasi untuk deteksi urutan DNA HIV menggunakan  $\text{Co(phen)}_3^{3+}$  sebagai indikator redoks. Kronopotensiogram untuk blanko (garis putus-putus) dan target [0.5mM 21-mer DNA HIV (garis tebal)], menggunakan 21-mer DNA HIV sebagai probe, berdasarkan kenaikan waktu hibridisasi: 1 (a), 2 (b), 5 (c), 10 (d), s pada +1.7V dan 2 menit pada +0.5V dalam larutan bufer asetat 0.2M pH 5.0, mengandung  $5 \times 10^{-7}\text{M}$  21-mer DNA HIV. Pengikatan indikator: 1 menit pada +0.5V dalam 0.02M Tris-HCl pH 7.0, 50 mM  $\text{Co(phen)}_3^{3+}$ . Stripping: dalam 0.02M Tris-HCl pH 7.0; arus: 28  $\mu\text{A}$ . Target: 21-mer DNA HIV: 5'-ACT-GCT-AGA-GAT-TTTCCA-CAT-3'). Probe: 21-mer DNA HIV: 5'-ATG-TGG-AAA-ATC-TCT-AGCAGT-3' (Wang *et al.* 1996).

Wang dan koleganya (1996d) melaporkan untuk pertama kalinya sifat unik yang ditunjukkan PNA dalam larutan pada saat diamobilisasi pada permukaan elektrode. Mereka mengevaluasi signal kronopotensiometri untuk reduksi  $\text{Co(phen)}_3^{3+}$  menggunakan dua probe yang berbeda, 15-mer DNA-CPE dan 15-mer PNA-CPE setelah hibridisasi. Dupleks PNA-DNA dapat terbentuk dengan sangat efisien pada kekuatan ion rendah 1mM atau pada temperatur setinggi 50°C, kondisi

demikian adalah tidak mungkin untuk memperoleh hibrid DNA/DNA. Berkaitan dengan struktur utama PNA, hibrid PNA-DNA menempel pada permukaan elektrode, seperti dalam larutan, adalah lebih stabil dibanding DNA/DNA. Ini merupakan alasan mengapa PNA digunakan untuk pengembangan beberapa biosensor.

Wang *et al.* (1997h) menggunakan PNA untuk pertama kalinya untuk mengembangkan sensor yang dapat mendeteksi *point mutation* dalam gen p53. Pada saat PNA-CPE dan DNA-CPE digunakan dengan urutan DNA non-mutasi, tidak terdapat pengganggu dalam lapisan biopengenal PNA (23,6%), pada variasi dengan satu diperoleh untuk probe DNA di bawah kondisi tersebut, bahkan pada temperatur menyimpang (42°C), menunjukkan bahwa probe PNA dapat membedakan dengan jelas *point mutation*.

### **2.2.1.c. Kompleks Besi.**

Takenaka *et al.* (2000) memperkenalkan penggunaan interkalator ferrocenylnaphtalene diimida. Senyawa ini membentuk suatu kompleks dengan dsDNA yang secara kinetik dan termodinamika lebih stabil dibanding dengan ssDNA. Perilaku indikator redoks ini tidak murni bersifat elektrostatik atau interkalatif, karena potensial formal dari pasangan konstan setelah berinterkalasi dengan ss dan dsDNA. Probe diperoleh dengan menuangi elektrode emas dengan tetesan yang mengandung 200 pmol mercaptohexyl-oligonukleotida selama 2 jam pada temperatur ruang. Hibridisasi dilakukan dengan menempatkan DNA target pada elektrode yang dimodifikasi dengan urutan probe. Kemudian elektrode direndam dalam 1mM larutan interkalator aqueous selama 5 menit, dan setelah dicuci

pengukuran dilakukan dalam larutan bufer asetat yang mengandung 40mM KCl. Voltamogram DPV menunjukkan suatu peningkatan penting dalam arus pada 510 mV dengan keberadaan target, dengan suatu hubungan linier antara 10 dan 60 pmol. Hampir tidak ada perubahan yang teramati setelah interaksi dengan oligo(dT)<sub>20</sub> nonkomplementer. Mereka juga mengembangkan metodologi ini untuk mendeteksi DNA plasmid yang diperoleh dari bagian gen transport kolin dalam ragi dengan hibridisasi pada 25°C selama 20 menit. Limit deteksinya 1 fmol, sama seperti untuk oligonukleotida sintesis, yang telah dilaporkan. Tidak terdapat respons yang teramati untuk DNA plasmid yang diperoleh bukan dari gen target. Penulis juga mengajukan dua strategi tambahan untuk meningkatkan limit deteksi. Miyahara *et al.* (2002) juga melaporkan limit deteksi 0.1nM dalam penentuan polimorfisme nukleotida tunggal dalam gen p53 menggunakan ferrocenilnaftalena diimida sebagai indikator redoks.

### **2.2.2. Senyawa Organik**

#### **2.2.2.a. Acridine Orange**

Hashimoto *et al.* melaporkan penggunaan beberapa indikator redoks untuk deteksi terjadinya hibridisasi (Hashimoto *et al.* 1993, 1994a, b). Penggunaan elektrode grafit yang dimodifikasi probe DNA dan interkalator yang disebut *acridine orange* telah digunakan untuk deteksi hibridisasi. Bagaimanapun, karena ikatan indikator tidak hanya terhadap dsDNA tetapi juga terhadap ssDNA dan terhadap elektrode secara adsorpsi fisik, sehingga signal hibridisasinya kecil (Hashimoto *et al.* 1993).

#### **2.2.2.b. Hoestch 33258.**

*Hoestch 33258* merupakan pengikat *groove* minor, suatu pewarna aktif secara elektrokimia, digunakan sebagai indikator untuk deteksi DNA oncogene *v-myc* (Hashimoto *et al.* 1994a). Suatu DNA 20-mer merkaptotioheksil diimmobilisasi pada permukaan emas digunakan sebagai urutan probe. Hibridisasi dilakukan pada temperatur 40°C selama 1 jam dalam 0,300M NaCl dan 0,030M natrium sitrat, pH 7,0, sambil diaduk. Signal hibridisasi diperoleh dari arus oksidasi voltametri indikator redoks pada 0,550 V dengan selektivitas yang baik. Limit deteksinya adalah  $10^{-13}$  g/mL untuk pVM623 (4,2 kbp), yang mencakup  $4 \times 10^4$  copy DNA per mL.

### **2.2.2.c. Daunomycin.**

Senyawa ini banyak digunakan untuk deteksi terjadinya hibridisasi. Hashimoto *et al.* (1994b) mengevaluasi beberapa interkalator potensial: pewarna acridine, antibiotika antrasiklin dan tetrasiklin, pewarna ethidium, bisbenzimidazole, dan yang lainnya seperti *7-aminoactinomycin D*, *chromomycin A3*, *mithomycin A*, *olivomycin*, *vinblastine*, *propidium iodida*, *quincacrine mustard*, *4',6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride (DAPI)*, dan *rifampicin*. Dalam semua pengerjaan, DNA probe diadsorpsi pada elektrode *basal plane pyrolytic graphite* (BPPG) yang dihaluskan, selama 30 menit 100°C dan hibridisasi dilakukan pada temperatur 40°C selama 1 jam. Aktivitas potensial senyawa-senyawa sebagai indikator redoks dievaluasi dengan pengukuran pergeseran potensial puncak anodik yang diperoleh pada elektrode modifikasi dsDNA dan dibandingkan dengan elektrode modifikasi ssDNA. Di antara semua senyawa yang diuji, *daunomycin* adalah yang terbaik, karena menghasilkan pergeseran potensial puncak yang tertinggi. SPE yang

dimodifikasi dengan oligonukleotida sintesis dan fragmen DNA yang diekstraksi dari darah manusia dan diamplifikasi PCR digunakan untuk pengujian *daunomycin* sebagai indikator redoks untuk deteksi polimorfisme apolipoprotein E (Marraza *et al.* 2000), menunjukkan respons linier hingga 2 mg/L DNA target. Tidak terdapat pengganggu yang teramati dengan urutan nonkomplementer yang mengandung satu *mismatch* di tengah-tengah urutan. Limit deteksinya adalah 10 $\mu$ M. Biosensor ini dapat digunakan tidak hanya untuk deteksi oligonukleotida sintesis tetapi juga fragmen 244 pb yang mengandung dua kodon polimorfisme, 12 dan 158. Waktu hibridisasi yang lebih lama diperlukan untuk sampel sebenarnya (hingga 8 menit) untuk mengimbangi penurunan kecepatan hibridisasi sebagai konsekuensi dari penambahan panjang rantai. Penentuan yang sangat sensitif dan selektif diperoleh.

Marraza *et al.* (1999) mengajukan sensor elektrokimia *disposable* menggunakan 13-mer DNA sintesis yang diamobilisasi pada SPE dengan dua prosedur: adsorpsi langsung oligonukleotida pada permukaan yang di-*pretreatment*, dan amobilisasi oligonukleotida terbiotinilasi pada SPE modifikasi avidin. Hibridisasi dilakukan pada temperatur ruang dan transduksi dilakukan dengan PSA pada arus konstan dari signal oksidasi kronopotensiometri *daunomycin*. Limit deteksinya berturut-turut adalah 2 atau 3  $\mu$ g/mL untuk biosensor yang dipreparasi secara adsorpsi sederhana probe atau interaksi oligonukleotida terbiotinilasi-avidin.

Penggunaan *daunomycin* sebagai indikator redoks juga diajukan oleh kelompok Fang (Sun *et al.* 1998). Probe DNA 24-mer DNA diamobilisasi secara kovalen pada permukaan emas diderivatisasi dengan monolayer aminoetanatiol

secara *self-assemble*. Dalam penelitian ini signal hibridisasi diperoleh dari arus reduksi *daunomycin* yang terinterkalasi. Responsnya linier antara 0,1 ng/mL dan 0,1 µg/mL dan limit deteksinya adalah 30 pg/mL. Sampel digunakan sebagai target yaitu DNA sintesis 24-mer dan 400 pb yAl<sub>3</sub>DNA (komplementer) dan PNC<sub>3</sub>DNA (nonkomplementer) dengan perbedaan yang sangat nyata.

#### **2.2.2.d. Epirubicin**

*Epirubicin* merupakan obat antikanker yang dapat mengikat DNA melalui interkalasi dan digunakan sebagai indikator redoks untuk deteksi terjadinya hibridisasi (Erdem and Ozsoz 2001). Probe (17-mer oligonukleotida) diamobilisasi dengan adsorpsi pada CPE. Hibridisasi dilakukan dengan mencelupkan elektrode ke dalam larutan target selama 5 menit pada potensial 0,50V. Dengan keberadaan *double helix*, signal DPV adalah lebih kecil dikarenakan *shielding* dari gugus yang dapat dioksidasi setelah interkalasi. Hampir tidak ada perubahan dalam respons voltametri yang diperoleh, dibandingkan dengan blanko.

#### **2.2.2.e. Methylene Blue**

Senyawa ini adalah pewarna *3,7-bis (dimethylamino)phenothiazine-5-ium-chloride (methylene blue, MB)* yang dapat berinterkalasi dengan DNA (Kelley *et al.* 1997, 1999). Kerman *et al.* (2002) melaporkan penggunaan senyawa ini untuk deteksi terjadinya hibridisasi. Dalam satu kasus (Kerman *et al.* 2002) probe merupakan oligonukleotida yang terikat secara kovalen terhadap residu karboksilat yang berasal dari lapisan tiolasi yang diamobilisasi pada permukaan emas yang sebelumnya diaktivasi dengan N-hidroksisuksinimida dan karbodiimida. Signal hibridisasi

diperoleh dari penurunan arus reduksi MB yang menggambarkan inhibisi sterik dari gugus MB tereduksi yang dipak antara *bulky double helix* hibrid. Penggunaan MB juga diajukan untuk deteksi voltametri urutan DNA yang berkaitan dengan virus TT dan HBV (TT adalah inisial untuk pasien pertama yang terinfeksi virus ini) dari sampel sebenarnya yang diamplifikasi PCR (Meric *et al.* 2002). Probe dibuat secara adsorpsi pada CPE dengan 21- dan 24-mer oligonukleotida HBV dan TTV, berturut-turut. MB juga digunakan oleh kelompok Fang (Zhu *et al.* 2004) untuk deteksi terjadinya hibridisasi pada permukaan elektrode emas dimodifikasi zirkonium oksida. Hibridisasi dilakukan pada temperatur ruang selama 30 menit dengan mencelupkan elektrode termodifikasi dengan probe ke dalam larutan hibridisasi dengan pengadukan, yang mengandung DNA target. Interkalasi terjadi dalam larutan  $2,0 \times 10^{-5}$ M MB selama 5 menit dengan sirkuit terbuka. Deteksi elektrokimia dilakukan secara DPV dari signal reduksi pada 20,20 V. Arus menurun secara linier dengan logaritma dari DNA target  $2,25 \times 10^{-10}$  hingga  $2,25 \times 10^{-8}$  M, limit deteksinya  $1,0 \times 10^{-10}$  M. Ozkan *et al.* (2002) menunjukkan bahwa dengan DNA-CPE, MB dapat digunakan sebagai penanda redoks untuk deteksi hibridisasi pada CPE yang dimodifikasi PNA. Mereka mempelajari interkalasi MB dengan PNA pada elektrode merkuri dan CPE dengan kombinasi *adsorptive transfer stripping voltammetry*, *alternating current voltammetry*, dan *differential pulse voltammetry*.

#### **2.2.2.f. Hemin.**

Kara *et al.* (2002) mengajukan penggunaan hemin, suatu kompleks besi porfirin, sebagai indikator redoks, yang dihubungkan dengan penggunaan suatu GCE

dan DPV. Interaksi hemin dengan ss dan dsDNA diikuti dari arus reduksinya dalam larutan bufer asetat 0,50M yang dideoksigenasi, pH 4,80, mengandung 20 mM NaCl. Penurunan arus ini diamati setelah interkalasi dengan dsDNA karena tersembunyinya bagian molekul yang dapat tereduksi.

### **2.3. Berdasarkan Perubahan Sifat Listrik Film**

Perubahan dalam beberapa sifat intrinsik *double helix* seperti konduktivitas, kapasitansi, atau impedansi dapat digunakan untuk evaluasi pembentukan *double helix*.

Kelompok Wang (Wang *et al.* 1999b) mengajukan pendekatan menarik dan bebas penanda berdasarkan pada *doping* probe asam nukleat langsung ke dalam film polipirol. Matriks polimer dielektrogenasi secara potensiodinamika pada GCE menggunakan 0,05M pirol + 100 $\mu$ g/mL larutan probe oligonukleotida. Hibridisasi dilakukan dalam larutan 0,1M glisin/0,1M NaCl pada 0.15V dibawah kondisi dimana oligonukleotida anionik hanya sebagai *dopant*. Signal hibridisasi diperoleh pada 0,15V menggunakan polipirol yang dibuat dalam keberadaan oligo(dG)<sub>20</sub> dan oligo(dA)<sub>20</sub>. Setelah penambahan urutan komplementernya, respons negatif diperoleh, yang ditandai dengan naiknya densitas muatan dan ukuran *dopant* asam nukleat terhadap hibridisasi, begitu pula perubahan konduktivitas polimer. Dengan keberadaan urutan nonkomplementer signal ini positif dan berkaitan dengan perubahan konduktivitas yang berhubungan dengan repulsi elektrostatik atau adsorpsi.

Strategi yang lain untuk deteksi secara elektrokimia oligonukleotida pendek terdiri dari penggunaan suatu permukaan terstabilisasi membran lipid bilayer dari fosfatidilkolin telur yang dipreparasi pada elektrode perak yang dilapisi dengan suatu lapisan polimer dan kemudian dicelupkan ke dalam 0,1M KCl (Krull *et al.* 2000). ssDNA dimodifikasi dengan karbon alifatik C<sub>16</sub> menghasilkan suatu kenaikan densitas muatan negatif pada permukaan membran, menandakan sifat biopengenalan. Percobaan dengan label fluorescein dT<sub>20</sub>-C<sub>16</sub> menunjukkan bahwa reduksi dalam arus gabungan teramati setelah penambahan dA<sub>20</sub> berkaitan dengan pelepasan *double helix*.

Vagin *et al.* (2003) mengajukan penggunaan elektrode emas yang dimodifikasi dengan surfaktan yang disebut Brij-52. Probe DNA dipreparasi dengan meneteskan emas dengan 5µL larutan etanolat Brij-52, diikuti dengan evaporasi pelarut. Selanjutnya, elektrode dibiarkan untuk berinteraksi dengan probe oligonukleotida yang mengandung rantai hidrokarbon panjang, C<sub>16</sub>pdT<sub>5</sub>, yang terakumulasi ke dalam daerah hidrofobik bilayer surfaktan. Signal yang diperoleh dari pengukuran impedansi pada 0,1 V vs. Ag/AgCl, 1MKCl pada temperatur ruang merupakan dari penurunan komponen sebenarnya. Penurunan ini pada frekuensi tinggi berkaitan dengan resistensi membran seiring kenaikan kapasitansi dari violasi lokal inner bilayer.

#### 2.4. Berdasarkan Penggunaan Skema Amplifikasi Signal

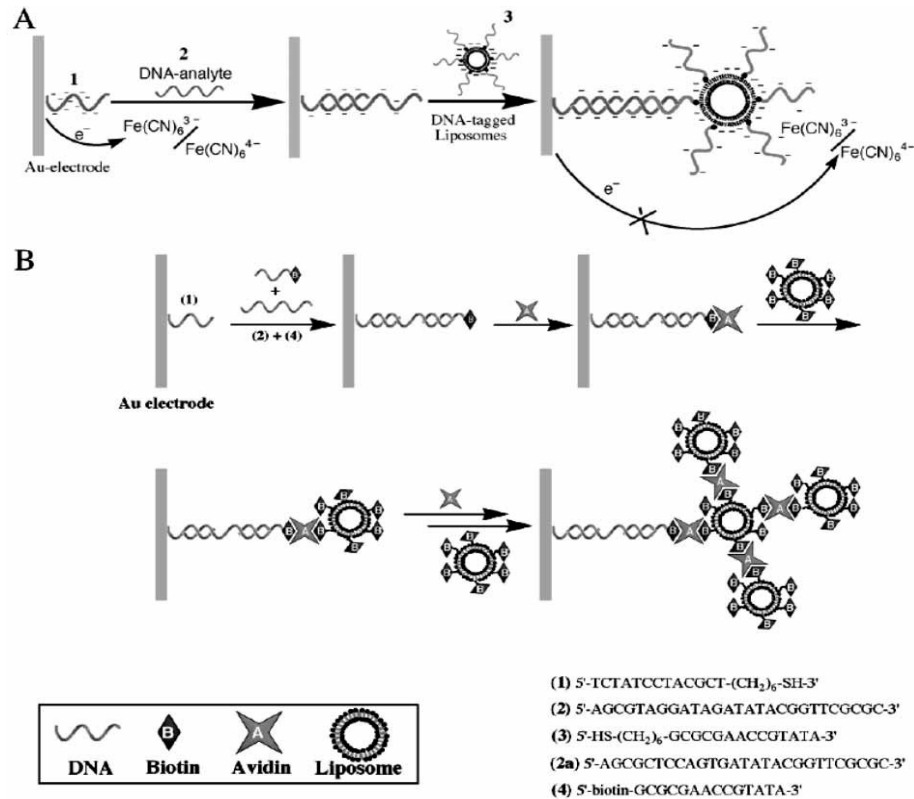
Suatu kesempatan yang sangat menarik untuk meningkatkan sensitivitas pengujian untuk deteksi terjadinya hibridisasi adalah amplifikasi signal. Daftar publikasi panjang yang mendukung strategi baru yang penting ini telah dihasilkan.

Kelompok Willner mempresentasikan penggunaan liposom bertanda sebagai probe untuk amplifikasi proses *sensing* DNA dan memperoleh informasi tentang terjadinya hibridisasi secara *Faradaic impedance spectroscopy*, *quartz crystal microbalance*, dan pengukuran secara elektrokimia (Patolsky *et al.* 2000; Alfonta *et al.* 2001; Patolsky *et al.* 2001) (Gambar 3). Dalam satu kasus, oligonukleotida sulfanilheksil yang mengandung 13 basa ditempelkan pada elektrode emas, diikuti dengan hibridisasi dengan DNA target (Patolsky *et al.* 2000). Pada saat hibrid terbentuk, struktur yang dihasilkan berinteraksi dengan liposom yang dilabel dengan oligonukleotida lain yang berkomplementer terhadap salah satu bagian target. Liposom (220 nm) tersusun dari asam fosfatidat, fosfatidilkolin, maleimida-fosfatidiletanolamin, dan kolesterol. Tiap liposom mengandung 50-60 unit oligonukleotida yang menyumbangkan densitas muatan negatif terhadap permukaan. Kalium ferrisianida/ferrosianida digunakan sebagai penanda redoks yang ditolak oleh muatan negatif liposom, konsekuensinya meningkatkan resistensi transfer muatan dari 3 k $\Omega$  pada emas yang mengandung probe hingga 4,5 k $\Omega$  setelah pembentukan *duplex*, dan 15 k $\Omega$  setelah penggabungan liposom. Limit deteksinya adalah  $1,2 \times 10^{-12}$  M atau  $6 \times 10^{-16}$  mol dalam sampel analit dan selektivitas untuk oligonukleotida dengan 6 mutasi sangat ekselent.

Dalam konfigurasi yang lain penulis menggunakan liposom bermuatan negatif berlabel biotin. Dalam hal ini, liposom tersusun dari fosfatidilkolin, fosfatidiletanolamin, kolesterol, dan fosfatidil etanolamin terbiotinilasi yang berlabel residu biotin (550 unit biotin per liposom). Kelebihan prosedur ini adalah dapat menaikkan amplifikasi, karena setelah asosiasi avidin/liposom terbiotinilasi resistensi naik hingga 17 k $\Omega$  dan 20 k $\Omega$ . Dengan dua kali tahap memungkinkan untuk mendeteksi  $5 \times 10^{-14}$ M atau  $2,5 \times 10^{-17}$  mol dalam sampel analit. Penggunaan liposom berlabel biotin dan HRP untuk mengamplifikasi signal juga diajukan (Alfonta *et al.* 2001). Liposom dimodifikasi biotin dan HRP diamobilisasi pada temperatur ruang diikuti dengan reaksi dengan 4-kloro-1-naftol ( $1 \times 10^{-3}$ M) plus  $1,5 \times 10^{-4}$ M hidrogen peroksida. Perubahan dalam resistensi transfer elektron digunakan sebagai signal analitik, limit deteksinya adalah  $6,5 \times 10^{-13}$ M.

Alternatif lain adalah penggunaan liposom yang mengandung oligonukleotida yang menjadikan terbentuknya struktur dendritis (Patolsky *et al.* 2001). Penulis mengajukan penggunaan liposom yang dimodifikasi dengan oligonukleotida komplementer terhadap bagian DNA target. Prosedur dimulai dengan amobilisasi probe pada permukaan emas, diikuti dengan hibridisasi pada permukaan elektrode, menyisakan bagian bebas untuk berinteraksi dengan liposom berpenanda DNA. Pendekatan lain adalah berdasarkan penggunaan oligonukleotida terbiotinilasi untuk membentuk *double helix* yang akan kembali berhibridisasi dengan probe. Selanjutnya, pada saat target terikat terhadap oligonukleotida terbiotinilasi berhibridisasi dengan urutan probe, avidin ditambahkan untuk bergabung dengan

liposom terbiotinilasi. Dalam hal ini, penambahan avidin dan liposom memungkinkan untuk terbentuknya struktur dendritis yang dapat mendeteksi  $1 \times 10^{-13}$  M DNA target.



<sup>a</sup> Oligonucleotides 1, 2, and 3 are represented by blue, green, and red wavy curves, respectively. <sup>b</sup> Green wavy lines indicate oligonucleotide 2, blue wavy curves correspond to oligonucleotide 4, blue diamonds correspond to biotin, red stars represent avidin.

Gambar 3. (A) Sensing DNA target yang diamplifikasi dengan liposom terfungsionalisasi oligonukleotida, (B) Sensing DNA target oligonukleotida terbiotinilasi. Avidin dan liposom berlabel biotin sebagai konjugat amplifikasi (Patolsky *et al.* 2001).

Lumley-Woodyear *et al.* (1996) mengajukan deteksi terjadinya hibridisasi menggunakan poli(deoksitimidin)-5'-fosfat (pd(T)<sub>25-30</sub>) sebagai probe dan poli(deoksiadenosin)-5'-fosfat (pd(A)<sub>25-30</sub>) dilabel dengan target *horseradish peroxidase*. Deteksi dilakukan pada 0,0 V vs Ag/AgCl dari reduksi Os<sup>3+</sup> yang dihasilkan selama regenerasi enzimatis. Respons untuk urutan nonkompleter sekitar

5% dari urutan komplementer. Caruana *et al.* (1999) juga mengajukan penggunaan elektrode dengan diameter 7  $\mu\text{m}$  dimodifikasi dengan suatu polimer Os. Penentuan dilakukan pada 20,06 V setelah penambahan target yang dilabel dengan *soybean peroxidase* (SBP). Kontak listrik antara SBP dan elektrode didasarkan melalui polimer redoks, yang dapat mereduksi elektrokatalitik hidrogen peroksida. Di bawah kondisi ini memungkinkan untuk deteksi 40.000 copy dan membedakan *mismatch* basa tunggal dalam oligonukleotida 18-mer.

Pendekatan lain dilaporkan penggunaan elektrode karbon yang dimodifikasi dengan polimer osmium dan avidin, dimana urutan probe terbiotinilasi diamobilisasi (Campbell *et al.* 2002). Hibridisasi dilakukan selama 30 menit diikuti dengan penggabungan urutan berlabel *horseradish peroxidase* (setelah inkubasi 15 menit). Signal analitik merupakan arus katalitik pada 0,0 V vs. Ag/AgCl berkaitan dengan reduksi 1mM hidrogen peroksida. Analit adalah *E. coli* 16S rRNA (60 basa). Telah dilaporkan pula kemungkinan deteksi urutan komplementer dalam keberadaan DNA salmon dan serum kambing.

Kemajuan berarti dalam deteksi DNA target dibandingkan dengan hasil sebelumnya diperoleh dengan penggunaan uji *sandwich-type-enzyme-amplified* (Zhang *et al.* 2003). Limit deteksinya adalah 0,5 fM yang dicapai dengan konfigurasi ini. Mereka menggunakan GCE 10  $\mu\text{m}$  dimodifikasi dengan PAA-PVP-Os. Hibrid yang dihasilkan diupayakan terhadap oligonukleotida 18-mer berlabel 10nM HRP, dan deteksi terjadinya hibridisasi dilakukan secara amperometri pada 0,12 V dalam larutan PBS setelah penambahan 1mM hidrogen peroksida. Respons linier antara

ujung 5 dan 200 zmol (3000 hingga 12000 copy) target. Hal ini memungkinkan untuk mengukur 0,5 fM DNA, yaitu sekitar 3000 copy dalam 10  $\mu$ L droplet.

Penukaran HRP dengan bilirubin oksidase, suatu enzim yang mengkatalisis reduksi oksigen sekitar terhadap air, menghasilkan skema lebih sederhana dengan sensitivitas tinggi dalam penentuan DNA *Shigella flexneri*, dalam hubungannya dengan polimer PAA-PVP-Os dan 10- $\mu$ m GCE (Zhang *et al.* 2004). Dalam hal ini deteksi terjadi dalam level femtomolar,  $10^{-15}$ M dalam 5  $\mu$ L larutan, sama dengan limit deteksi sebelumnya yang diajukan oleh penulis yang sama menggunakan HRP.

Suatu lapisan *sensing* untuk deteksi terjadinya hibridisasi diperoleh dengan deposisi secara bertahap dari polielektrolit telah dilaporkan oleh Domínguez *et al.* (2004). Penulis menggambarkan keberhasilan pelabelan oligonukleotida dengan enzim sebagai rute baru untuk amplifikasi signal hibridisasi dengan tahapan hibridisasi bertingkat. Biosensor dipreparasi secara *self assembling* dari poli[(vinil-piridin)Os(bpy)<sub>2</sub>Cl] kationik pada elektrode emas diikuti dengan penggabungan HRP anionik yang dimodifikasi secara kimia dan suatu lapisan baru dari polimer redoks. Ketika struktur terbentuk, DNA terikat secara kovalen melalui gugus fosfat 3'.

Tahap berikutnya merupakan titik kunci dari rute baru berkaitan dengan penggabungan GO<sub>x</sub> yang dimodifikasi dengan banyak oligonukleotida yang membuat kemungkinan transduksi langsung dari terjadinya hibridisasi dan amplifikasi dengan tahap hibridisasi bertingkat. Dalam hal ini, setelah penambahan glukosa, dihasilkan hidrogen peroksida, dimana setelah difusi cepat, dapat dideteksi dengan amobilisasi HRP dekat permukaan elektrode. Urutan dari tahap hibridisasi dapat diulang

mengikuti bangunan arsitektur dendritis yang menjadikan peningkatan penting dalam sensitivitas. Metodologi ini mendapatkan kuantifikasi oligonukleotida 44-mer pada level 1 nM setelah 30 menit hibridisasi.

Suatu metode *biosensing* elektrokimia berdasarkan pembentukan pasangan avidin-fosfatase basa terhadap oligonukleotoda terbiotinilasi telah dilakukan oleh Xu *et al.* (2001). Transduser adalah suatu elektrode lapisan emas fotolitografi yang dimodifikasi dengan DNA 20-mer dari bagian segmen DNA antigen B core hepatitis, dimodifikasi dengan suatu gugus merkptoheksil pada ujung 5'-nya. Hibridisasi dilakukan dalam mikrosel (150  $\mu$ L) yang berisi DNA komplementernya yang terbiotinilasi pada temperatur 37°C selama 1 jam. Setelah hibridisasi berhenti, elektrode diinkubasi selama 15 menit dengan avidin-fosfatase basa, dengan keberadaan  $\alpha$ -naftilfosfat, yang tertransformasi dalam  $\alpha$ -naftol elektroaktif. Arus puncak oksidasi  $\alpha$ -naftol digunakan sebagai signal analitik. Dengan menggunakan sampel DNA plasmid HBV, limit deteksinya adalah 0,22 nmol/L (30 fmol dalam 5  $\mu$ L sampel). Hanya masalah dalam metodologi ini adalah selektivitas, karena *mismatch* 3 basa mengganggu 7,5% sementara *mismatch* 2 basa sebesar 47,6%.

Kim *et al.* (2003) mengajukan penggunaan dendrimer *ferrocenyl-tethered poly(amido-amine)* (FcD) secara parsial sebagai elektrokatalis untuk amplifikasi deteksi terjadinya hibridisasi. Probe terikat secara kovalen terhadap dendrimer dan berhibridisasi dengan DNA target 31-mer pada temperatur ruang selama 2 jam. Dalam tahap berikutnya, oligonukleotida terbiotinilasi bergabung dengan struktur secara *sandwich-type*. Kemudian, konjugat avidin-alkaline fosfatase bergabung

dengan struktur dan p-aminofenil fosfat yang berkonversi secara enzimatik menjadi p-aminofenol, dimana setelah terdifusi mendekati lapisan FcD secara elektrokatalitik teroksidasi menjadi quinoimida. Arus elektrokatalitik yang dimonitor secara voltametri siklik merupakan signal hibridisasi. Limit deteksinya adalah 20 fmol. Biosensor diuji dengan target yang mengandung *mismatch* satu basa dan arus elektrokatalitiknya yaitu 22,7% dari satu yang diperoleh dengan komplementer target. Mereka menemukan penurunan bertahap respons elektrode setelah pengulangan percobaan terutama berkaitan dengan peningkatan deaktivasi enzim yang terikat.

Pividori *et al.* (2003) melakukan deteksi amperometri dari ampikon dihubungkan dengan urutan spesifik DNA IS200 *Salmonella spp* (probe 292 pb probe dari IS200 ujung 5'). Hibridisasi dengan target terbiotinilasi dilakukan pada temperatur 42°C dalam volume larutan 150 µL selama 45 menit. Kemudian pelabelan dengan inkubasi konjugat enzim, HRP-streptavidin pada temperatur 42°C dan penentuan secara amperometri dilakukan pada 20,10 V dalam keberadaan hidroquinon setelah penambahan 1,06 mM hidrogen peroksida.

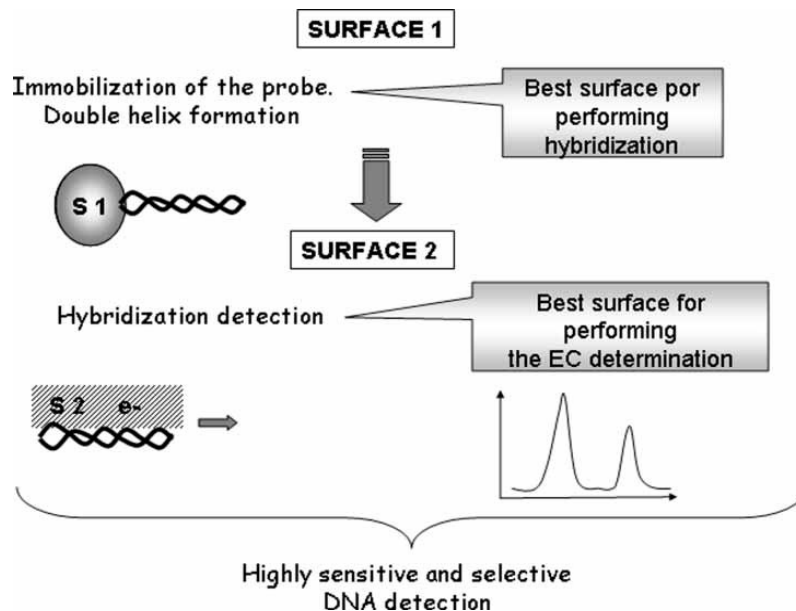
## **2.5. Berdasarkan Penggunaan Permukaan yang Berbeda untuk Hibridisasi dan Deteksi**

Sesuatu yang baru, menarik, dan strategi yang sangat inovatif untuk keberhasilan yang tinggi deteksi terjadinya hibridisasi telah dilaporkan dalam tahun terakhir. Pada dasarnya, hal tersebut berdasarkan penggunaan dua permukaan yang berbeda, satu untuk melakukan hibridisasi dan yang lainnya untuk deteksi terjadinya hibridisasi (Gambar 4). Kombinasi ini membiarkan pilihan dari permukaan yang

paling baik untuk melakukan hibridisasi dan satu lagi yang paling baik untuk melakukan penentuan secara elektrokimia. Dengan cara ini, adalah memungkinkan untuk untuk menganalisis DNA secara sangat sensitif dan selektif.

### **2. 5.1. Berdasarkan Deteksi Basa-Basa Secara Elektrokimia**

Kelompok Palecek (Palecek *et al.* 2002c) mengajukan penggunaan *magnetic beads* yang dapat dibeli, yang diderivatisasi dengan oligo(dT)<sub>25</sub> untuk melakukan hibridisasi dalam volume yang sama 0,2M NaCl dan 50mM bufer fosfat pH 7,0, pengadukan selama 30 menit. Setelah hibridisasi dan pencucian, DNA dilepaskan dari *magnetic bead* dengan pemanasan pada temperatur 85°C selama 2 menit dalam 20 µL air trides. Depurinasi dilakukan dalam larutan HClO<sub>4</sub> panas selama 30 menit. Setelah dingin dan netralisasi, larutan yang dihasilkan ditambahkan terhadap elektrolit pendukung untuk dideteksi secara elektrokimia. Hal itu dilakukan dalam dua arah, satu difokuskan pada penentuan basa dengan sensitivitas tinggi pada merkuri, melalui pembentukan senyawa sedikit larut, dan yang lainnya berdasarkan penggunaan oligonukleotida berlabel osmium tetroksida, 2,2'-bipiridina. Dalam hal ini, signal hibridisasi diperoleh dari evolusi hidrogen katalitik dalam keberadaan osmium. Penggunaan material karbon untuk penentuan oksidasi residu G dan A atau DNA target modifikasi Os-bpy juga telah dilaporkan.



Gambar 4. Skema penggunaan dua permukaan untuk deteksi dan terjadinya hibridisasi (Rivas *et al.* 2005).

Palecek *et al.* (2002d) juga mengajukan deteksi DNA dan RNA bebas-label berdasarkan penentuan residu adenin yang dilepaskan dengan *treatment* asam. Pengujian menggunakan deteksi poliA dan mRNA [*crude* mRNA dari sel *tobacco bright yellow*]; oligo(dA)<sub>12</sub>, dan oligo(dA)<sub>25</sub> GGAGGAG; dan suatu DNA produk PCR (226 pb yang mengandung bagian (dA)<sub>25</sub>). Transduksi dilakukan pada suatu elektode *hanging mercury drop* secara *DPV stripping voltammetry* dalam 0.05M larutan boraks.

Wang *et al.* (2002a) mengajukan deteksi elektrokimia terjadinya hibridisasi yang bebas-label dari deteksi nukleobasa dengan keberadaan tembaga. Protokol untuk deteksi gen kanker payudara BRCA terdiri dari penempelan 19-mer oligonukleotida dengan substitusi inosin terbiotinilasi terhadap streptavidin yang ditutupi *magnetic bead*, diikuti dengan hibridisasi. Setelah pemisahan magnetik, *magnetic beads*

disuspensikan dalam NaOH selama 5 menit, dipindahkan ke dalam sel untuk penghancuran asam dengan keberadaan 3M asam sulfat, dan kemudian dipanaskan hingga kering. Setelah kering, residu disuspensikan dalam 0,5M asetat pH 5,9 dan 2 mg/L larutan tembaga(II) (pH akhir 4,8) dimana deteksi elektrokimia dilakukan menggunakan elektrode grafit. Kronopotensiogram menunjukkan dua proses, satu pada 0,87 V dan yang lainnya pada 1,18 V, untuk oksidasi guanin dan adenin berturut-turut. Signal naik dengan besar dengan keberadaan tembaga karena terbentuknya kompleks Cu(I). Puncak oksidasi guanin naik 16- dan 31- kali lipat dengan keberadaan 2 dan 4 mg/L tembaga berturut-turut. Limit deteksinya adalah 250 pg atau 40 fmol dalam 50  $\mu$ L volume sampel.

Wang *et al.* (2003a) mengajukan penggunaan GCE dimodifikasi dengan MWCNT sebagai suatu detektor dari gen kanker payudara BRCA1. Keberadaan nanotube karbon menghasilkan cara yang efisien untuk amplifikasi deteksi bebas-label secara elektrokimia untuk hibridisasi DNA. Kombinasi penghancuran sampel DNA dengan keberadaan tembaga, menghasilkan signal hibridisasi yang baik yang diperoleh dalam rentang 50–250  $\mu$ g $L^{-1}$  setelah 20 menit hibridisasi. Limit deteksinya adalah 40 ng/mL, 2 ng, atau 100 fmol dalam 50  $\mu$ L larutan hibridisasi.

## **2. 5.2. Berdasarkan Pada Deteksi Partikel Logam Yang Terikat Pada Hibrid**

Katz, Willner dan Wang (2004) mempresentasikan suatu *review* tentang penelitian dengan penggunaan logam, semikonduktor, dan partikel magnetik sebagai unit fungsional untuk aplikasi elektroanalitik. Wang (2003) meringkas kemajuan

terkini dalam perkembangan pasangan nanopartikel/polinokleotida baru untuk peningkatan deteksi urutan spesifik DNA secara listrik.

#### **2.5.2.a. Deteksi Emas.**

Wang *et al.* mempresentasikan penggunaan *stripping* logam untuk pertama kalinya (Wang *et al.* 2001a) untuk deteksi urutan DNA dari gen kanker payudara BRCA 1 menggunakan penanda emas koloidal. Protokolnya terdiri dari:

a) amobilisasi oligonukleotida probe terbiotinilasi pada magnetic beads modifikasi avidin; b) Hibridisasi; c) Interaksi dengan nanopartikel logam dilapisi streptavidin; d) Pelarutan emas dalam 1M HBr + 0.1mM Br<sub>2</sub>; e) Prekonsentrasi emas pada elektrode *screenprinted* dengan penerapan 20,8 V selama 2 menit; f) Deteksi elektrokimia dalam larutan 1M HBr + 0.1mM Br<sub>2</sub> secara PSA pada arus konstan 5,0  $\mu$ A. Limit deteksinya adalah 100 g/mL atau 5 ng dalam 50  $\mu$ L sampel.

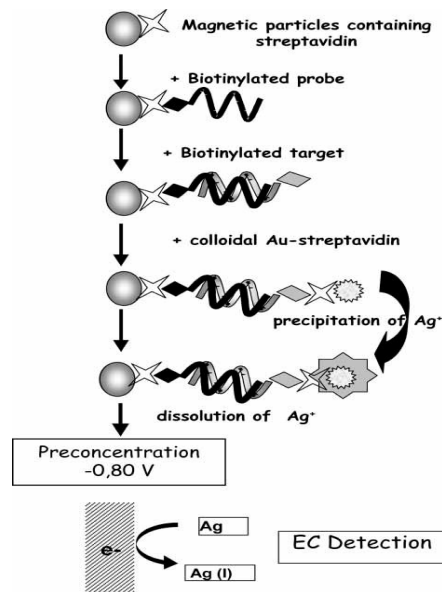
#### **2.5.2.b. Deteksi Perak.**

Kemajuan yang ekselent dalam sensitivitas dilaporkan dengan melibatkan tahap deposisi perak setelah interaksi dengan partikel emas-streptavidin (Gambar 5) (Wang *et al.* 2001b). Dalam hal ini, penentuan kronopotensiometri dilakukan secara PSA pada SPE setelah pelarutan perak yang terdeposit dalam asam nitrat. Limit deteksinya adalah 0,2 ng/mL, 32 pM, 10 pg, atau 1,5 fmol dalam 50 $\mu$ L larutan hibridisasi.

Suatu skema menarik berdasarkan penggunaan deteksi *stripping* elektrokimia padatan yang diinduksi secara magnetik dari penanda logam juga diajukan sebagai suatu alternatif untuk menurunkan jumlah tahapan dalam deteksi bagian gen kanker

payudara BCRA 1 (Wang *et al.* 2002b). Protokol berdasarkan pengumpulan *magnetic bead* yang mengandung hibrid dan presipitasi perak pada SPE. Medan magnet membuat agregat partikel DNA logam pada permukaan elektrode setelah tahap hibridisasi. Signal kronopotensiometri yang sangat baik dari akumulasi perak teramati pada 0,28 V. Suatu signal dengan 12 kali lipat lebih kecil, dibandingkan dengan urutan komplementer, teramati untuk DNA dengan *mismatch* basa tunggal. Limit deteksinya adalah 150 pg/mL atau 1,2 fmol diperoleh setelah 30 menit hibridisasi. Reprodusibilitas pengujian adalah sebesar 7%.

Strategi lain adalah berdasarkan deposisi besar-besaran perak dalam struktur DNA, dengan cara yang sama dengan yang digunakan ketika menggenerasi templat DNA dari nanokawat logam (Braun *et al.* 1998). Pada saat *double helix* terbentuk, kemudian dicelupkan dalam larutan yang mengandung  $\text{Ag}^+$  dan hidroquinon. Dalam hal ini, ion perak terikat pada *backbone* DNA bermuatan negatif secara interaksi elektrostatik dan dalam keberadaan hidroquinon mereka terdeposit sepanjang DNA. Setelah pelarutan dalam larutan asam nitrat, perak yang terdeposit direoksidasi pada permukaan elektrode. Signal oksidasi ini digunakan untuk mengevaluasi terjadinya hibridisasi.



Gambar 5. Deteksi terjadinya hibridisasi berdasarkan *stripping* penanda logam.

Protokol terdiri dari:

- Amobilisasi probe terbiotinilasi pada streptavidin-modified *magnetic beads*,
- Hibridisasi dengan target terbiotinilasi
- Interaksi dengan nanopartikel emas koloidal dilapisi streptavidin,
- Pengendapan perak,
- Pelarutan partikel perak,
- Deposisi perak terlarut pada SPE, dan
- Analisis stripping kronopotensiometri dari logam terdeposisi.

Wang *et al.* (2003b) melaporkan suatu protokol baru untuk deteksi hibridisasi DNA menggunakan DNA sebagai templat metalisasi. Protokol baru ini terdiri dari modifikasi emas dengan *cystamine* diikuti dengan amobilisasi probe DNA dengan pengikatan kovalen dengan karbodiimida. Setelah penghilangan DNA nonspesifik yang teradsorpsi, hibridisasi dilakukan dalam larutan bufer foafat 0,05M, pH 7,6, selama 30 menit pada temperatur ruang. Pada saat DNA nonhibridisasi dihilangkan, perak dikumpulkan secara elektrostatis pada hibrid dan setelah presipitasi dalam

keberadaan hidroquinon, dilarutkan dan dikuantifikasi dalam asam nitrat 0,1M/kalium nitrat 0,1M secara PSA pada SPE yang dipretreatment. Sensor dievaluasi dalam kaitannya dengan urutan DNA kanker payudara BCRA 1. Limit deteksinya adalah 100 ng/mL atau 5 ng dalam 50  $\mu$ L larutan hibridisasi.

#### **2.5.2.c. Deteksi Besi.**

Terjadinya hibridisasi juga dideteksi dengan pengukuran *stripping* runutan besi. Wang *et al.* (2003c) mengajukan dua protokol yang melibatkan penentuan besi, pertama berdasarkan pelabelan probe dengan nanopartikel besi dilapisi emas, dan kedua berdasarkan deteksi besi yang terdapat dalam penanda *magnetic-sphere* mikroskopik. Dalam kasus pertama target terbiotinilasi diamobilisasi pada *magnetic bead*, diikuti dengan hibridisasi dengan probe berlabel partikel besi/emas dan pelarutan emas dalam larutan 1M HBr + 0.1mM Br<sub>2</sub> dalam larutan bufer pH 9,0, yang mengandung 20  $\mu$ M nitroso naftol dan 40mM kalium bromat (digunakan untuk amplifikasi signal). Besi dideposit pada 20,05 V pada suatu *hanging mercury drop electrode* dan dideteksi secara DPV. Dalam kasus kedua, hibridisasi dilakukan dalam *microwell* modifikasi chitosan. Pada saat hibridisasi dilakukan, partikel yang mengandung besi dilarutkan dan besinya dikuantifikasi dengan *cathodic stripping voltammetry* dengan keberadaan 1-nitroso-2-naftol dan bromat. Pengujian menjadi alternatif baru untuk deteksi terjadinya hibridisasi.

#### **2.5.2.d. Cadmium Sulfida.**

Wang *et al.* melaporkan untuk pertama kalinya penggunaan nanopartikel anorganik biner seperti koloid CdS untuk deteksi terjadinya hibridisasi berdasarkan

penentuan kronopotensiometri sensitif terhadap runutan cadmium terlarut (Wang *et al.* 2002c). Protokol yang diajukan meliputi: a) Pengikatan target terbiotinilasi terhadap *magnetic bead* yang tertutup oleh streptavidin, b) Interaksi dengan probe yang dilabel CdS, c) Pelarutan nanopartikel dalam larutan HNO<sub>3</sub> 1M; dan d) Penentuan kronopotensiometri dari ion cadmium terlarut pada film merkuri GCE.

Signal cadmium yang bagus diperoleh pada -0,52 V dengan perbedaan yang jelas terhadap urutan nonkomplementer dalam kelebihan yang besar. Limit deteksinya adalah 20 ng/mL atau 100 fmol dalam 50  $\mu$ L sampel.

Patolsky *et al.* (2003) melaporkan dengan kekecualian limit deteksi yang rendah untuk DNA virus menggunakan partikel magnetik dimodifikasi asam nukleat., dalam hubungannya dengan *chemiluminiscence* sebagai mode transduksi. Skemanya terdiri dari tahap-tahap berikut: a) Modifikasi partikel magnetik 5 mm dengan primer bertiolasi menggunakan ester *cross-linker 3-maleidopropionicacid N-hydroxysuccinimide* heterobifungsional; b) Hibridisasi dengan ssDNA M13  $\Phi$  (7229 basa); c) Polimerisasi dengan keberadaan campuran dGTP, dATP, dCTP, dan suatu dUTP terbiotinilasi. Selanjutnya, setelah polimerisasi sejumlah besar unit biotin diperkenalkan; d) Interaksi dengan konjugat avidin-HRP; e) Interaksi dengan partikel magnetik modifikasi naftoquinon; f) Pembentukan hidrogen peroksida dengan penerapan potensial untuk mereduksi naftoquinon, O<sub>2</sub> dapat direduksi secara elektrokatalitik menjadi H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Oksidasi luminol dengan hidrogen peroksida terelektrogenerasi dihasilkan dalam *chemiluminiscence* dan emisi cahaya. Intensitas cahaya yang dipancarkan

meningkat dalam hubungan yang linier dengan  $\omega^2$  ketika partikel magnetik diputar. Limit deteksinya adalah  $8,3 \times 10^{-18} \text{M}$  atau 50 copy per 10  $\mu\text{L}$ .

Wang *et al.* (2003c) mengajukan suatu skema efektif untuk amplifikasi hibridisasi DNA berdasarkan penggunaan elektrode *single wall carbon nanotubes* (SWCNT) membawa partikel CdS dikombinasikan dengan deteksi *stripping voltammetric* dari penanda CdS terlarut. Nanotube yang diaktivasi didispersikan dalam toluena untuk dicampurkan dengan CdS termodifikasi oligonukleotida. Setelah inkubasi 4 jam dilakukan pengadukan dan pemisahan nanopartikel yang tak terikat dan penghilangan toluena, CNT diaduk dengan streptavidin dan oligonukleotida terbiotinilasi yang disebut probe 2. Probe 1 terbiotinilasi ditambahkan pada keping uji streptavidin dan hibridisasi dilakukan pada temperatur ruang setelah penambahan probe 2-coated-SWCNT-CdS-streptavidin. Setelah 1 jam CdS dilarutkan dalam asam nitrat 1M. Penentuan elektrokimia dari kadmium dilakukan pada elektrode film merkuri-karbon gelas secara SWV. Di bawah kondisi ini limit deteksinya adalah 40 pg/mL atau 330 amol dalam 50  $\mu\text{L}$  larutan.

Kelompok Wang (2003d) melaporkan suatu deteksi DNA multitarget secara elektrokimia berdasarkan penggunaan koloid anorganik lain, penanda (*quantum dots*, QD). Biosensor ini digunakan untuk deteksi tiga oligonukleotida sintesis 60-mer yang berbeda yang berkaitan dengan gen kanker payudara BRCA1, dan hal tersebut berdasarkan pada penggunaan tiga nanopartikel encapsul, CdS, PbS, dan ZnS. Setelah hibridisasi dengan target DNA dan hibridisasi selanjutnya dengan probe berlabel QD,

QD dideteksi secara *stripping* DPV pada elektrode film merkuri. Signal diperoleh pada 21,12 V, 20,68 V, dan 20,53 V untuk Zn, Cd dan Pb, berturut-turut.

### **2.5.3. Berdasarkan Pada Deteksi Marker Redoks Yang Terjebak Dalam *Microstyrene Bead* Yang Terikat Pada Hibrid**

Pendekatan lain yang menarik untuk penentuan terjadinya hibridisasi dengan sensitivitas tinggi adalah berdasarkan penggunaan penanda *microstyrene microbead* secara internal didahului dengan marker elektroaktif *ferrocenecarboxaldehyde* (FCA) (Wang *et al.* 2003e). Suatu *microsphere* yang mengandung  $5 \times 10^{11}$  molekul FCA yang tertutup neutravidin yang membuat interaksi dengan target terbiotinilasi dan kemudian berhibridisasi dengan probe terbiotinilasi yang diamobilisasi pada *magnetic bead*. Marker dideteksi dari signal kronopotensiometri yang diperoleh pada 0,88V menggunakan GCE. Limit deteksinya adalah 1 pg/L, sekitar  $10^{-16}$ M atau  $5,1 \times 10^{-21}$  mol, atau 31.000 molekul dalam 50  $\mu$ L sampel.

*Microsphere target-labeled-gold-loaded-polystyrene* juga digunakan untuk deteksi terjadinya hibridisasi (Kawde *et al.* 2004). Signal yang ditingkatkan menggunakan presipitasi emas katalitik pada nanopartikel emas yang terdapat dalam hibrid atau menggunakan format sandwich. Transduksi elektrokimia diperoleh dengan oksidasi dari emas yang dielektrodeposisi. Di bawah kondisi tersebut diperoleh limit deteksi 6 pM atau 2 pg atau 300 amol dalam 50  $\mu$ L sampel.

### **2.5.4. Berdasarkan Deteksi Produk Enzimatis Menggunakan Enzim-Enzim Yang Diikat Terhadap Hibrid**

Suatu uji genomagnetik berdasarkan pada pembentukan pasangan alkalin fosfatase terhadap hibrid dan penggunaan SPE untuk melakukan penentuannya

dilaporkan oleh kelompok Wang (Wang *et al.* 2002d). Konjugat *microsphere* yang berhibridisasi berinteraksi dengan streptavidin-alkaline fosfatase selama 25 menit dan transduksi dilakukan setelah penambahan substrat yaitu suatu naftil fosfat dari produk oksidasi enzimatis,  $\alpha$ -naftol. Limit deteksinya adalah 10 ng/L setelah 20 menit hibridisasi atau 500 pg dalam 50 mL sampel. Protokol ini ditingkatkan untuk penentuan simultan dari dua target DNA (Wang *et al.* 2002e). Bentuk ini berdasarkan pada suatu isolasi magnetik dari *duplex* DNA dan amplifikasi diperoleh dengan menggunakan  $\beta$ -galaktosidase dan alkaline fosfatase dalam kaitannya dengan analisis *stripping* kronopotensiometri dari produk-produk enzimatisnya, fenol dan  $\alpha$ -naftol pada elektrode kerja pensil grafit yang dapat dibarukan (pada 0,63 dan 0,31 V, berturut-turut). Limit deteksinya adalah 0,7 dan 0,9 ng/mL atau 5,5 fmol dalam 50  $\mu$ L sampel untuk dua target.

Bagel *et al.* (2000) mengajukan suatu sensor elektrokimia *disposable* untuk *cytomegalovirus* manusia berdasarkan penggunaan SPE yang dilapisi dengan nafion disesuaikan terhadap dasar *mikrowell* polistirena. DNA terdenaturasi yang diamplifikasi PCR diamobilisasi, diikuti dengan hibridisasi dalam larutan yang mengandung 50 ng/mL oligonukleotida probe yang terbiotinilasi. Setelah pembilasan dan konjugasi dengan streptavidin-alkaline fosfatase selama 15 menit, substrat dibiarkan bereaksi selama 30 menit dan deteksi dilakukan dengan CV. Penulis melaporkan limit deteksinya 10 amol/mL.

Cabig-Ciminska *et al.* (2004) mengajukan suatu detektor listrik berdasarkan chip silikon dipasangkan dengan hibridisasi pada *magnetic bead* untuk deteksi 16S

rRNA dalam ekstrak *E. coli*. *Gold microelectrode array* terdiri dari empat pasang elektrode interdigitasi plus dua elektrode pembantu. Tahap-tahap preparasi biosensor tersebut: a) Amobilisasi probe terbiotinilasi; b) Hibridisasi dengan target; c) Hibridisasi bertingkat dengan oligonukleotida berlabel digoksinin; d) Inkubasi dengan suatu konjugat antidigoksinin-alkaline fosfatase; e) Penambahan p-aminofenol fosfat; f) Deteksi amperometri untuk menurunkan p-aminofenol setelah pentransferan pada chip.

Pengukuran dilakukan dengan set potensial dari satu jari pada 250 mV sementara yang lainnya -50 mV. Dalam hal ini suatu resiklus terjadi antara p-aminofenol dan *quinoneimine* (produk reduksinya) mengamplifikasi respons amperometri. Perbedaan antara respons anodik dan katodik adalah penggunaannya sebagai signal. Dengan pengujian ini adalah memungkinkan untuk mendeteksi  $10^{11}$  –  $10^{10}$  molekul target

Suatu *biosensing* listrik ultrasensitif DNA diajukan dengan menggunakan CNT untuk pengenalan dan untuk terjadinya transduksi (Wang *et al.* 2004). Alkaline fosfatase diamobilisasi pada CNT menggunakan linker karbodiimida. Hampir  $10^4$  kali peningkatan sensitivitas diperoleh dalam keberadaan CNT yang dimodifikasi dengan alkaline fosfatase. Bagaimanapun, jika menggunakan GC dimodifikasi dengan nanotube karbon sebagai transduser, amplifikasi kedua diperoleh (30 kali lipat), dalam kaitannya dengan penambahan akumulasi produk enzimatis  $\alpha$ -naftol dengan keberadaan CNT. Limit deteksi yang rendah diperoleh selama akumulasi 20 menit, sekitar 1 fg/mL, atau 54 aM, atau 820 copy, atau 1.3 zmol dalam 25  $\mu$ L sampel.

### 2.5.5. Berdasarkan Metodologi Lain

Palecek *et al.* (2002e) mempresentasikan untuk pertama kalinya penggunaan immunogenisitas dari DNA termodifikasi untuk pengembangan biosensor hibridisasi DNA. Respons imunologi DNA dan RNA dapat ditingkatkan dengan modifikasi kimia menggunakan Os,bpy. *Magnetic bead* yang mengandung oligo(dT)<sub>25</sub> diletakkan dan dihubungkan dengan Os,bpy-DNA untuk dikenali antibodi primer yang mengandung residu 25-adenin diikuti dengan interaksi dengan antibodi sekunder yang dilabel *alkaline* fosfatase. Dalam hal ini, setelah penambahan 1-naftilfosfat, produknya,  $\alpha$ -naftol dapat ditentukan secara elektrokimia. Pengukuran langsung DNA target yang dimodifikasi secara kimia secara *adsorptive stripping* SWV pada *pyrolytic graphite* yang di-*pretreatment* pada -1,7 V selama 60 detik dalam elektrolit (bufer asetat 0,2 M, pH 5,0) juga dilaporkan. DNA dilepaskan dari *magnetic bead* dengan pemanasan pada temperatur 85°C selama 2 menit, diikuti dengan penambahan NaCl hingga 0,2M. Penulis juga menunjukkan adanya kemungkinan untuk menentukan DNA-Os,bpy tanpa pemisahan sebelumnya produk tambahan dari campuran reaksi. Metodologi juga diuji dengan produk PCR 226 pb DNA dengan residu (dA)<sub>25</sub>. Setelah presipitasi etanol dan modifikasi Os,bpy, dihibridisasi dalam konsentrasi 5 dan 2,5  $\mu\text{g/mL}$ . Limit deteksi dalam tahap hibridisasi dihitung adalah 3 fmol menggunakan sel 1mL. Jika menggunakan dua sistem elektrode dan 20  $\mu\text{L}$ , dalam 1 pg target akan terdapat 30 amol.

Evtugyn *et al.* (2003) mengajukan penggunaan elektrode *graphite screen-printed* dimodifikasi dengan DNA dan enzim untuk deteksi antibodi DNA manusia

dari *lupus erythematosus* sistemik dan *bronchial asthma*. SPE di-*treatment* secara elektrokimia dan kemudian dilapisi dengan larutan stok DNA dan peroksidase atau kolinsterase yang mengandung 0,01% gelatin, diikuti dengan penambahan 5  $\mu$ L glutaraldehid, dan tahap pengeringan selama 15 menit pada temperatur ruang. Signal analitik merupakan arus yang diukur pada 680 mV atau -150 mV setelah penambahan S-asetiltiokolin atau hidroquinon, berturut-turut. Pada saat menguji sampel sebenarnya, 20  $\mu$ L serum darah disebarkan pada daerah kerja, setelah inkubasi, pengukuran amperometri dilakukan, dan diperoleh penurunan signal menunjukkan pembentukan tambahan antibodi DNA yang menurunkan aksesibilitas enzim dalam reaksi enzimatik dengan substrat.

Suatu protokol inovatif berdasarkan perubahan konformasi oligonukleotida probe telah diajukan akhir-akhir ini (Fan *et al.* 2003). Probe terdiri dari struktur DNA *stem-loop* dengan penanda elektroaktif ferrosin (28-mer), diamobilisasi secara *self-assembly* melalui residu tiol pada permukaan emas polikristalin. Satuan *stem loop* didisain memiliki lima basa komplementer pada ujung 5' dan 3' (empat dari mereka adalah pasangan G-C) sehingga *stem-loop* dengan kedua ujungnya sangat dekat pada permukaan emas dan menjaga ferrosin pada ujung 5' dekat dengan permukaan emas. Perubahan besar konformasi dihasilkan setelah hibridisasi karena meningkatnya jarak antara ferrosin dan elektrode, menurunkan signal voltametri dari residu ferrosin (pada 0,492 V. Limit deteksinya adalah 10pM setelah inkubasi 30 menit.

Cara lain deteksi listrik hibridisasi DNA adalah berdasarkan penggunaan runutan batang mikro indium yang diperoleh secara elektrodeposisi logam ke dalam

pori membran alumina yang dilaporkan oleh Wang *et al.* (2003f). Batang indium/emas dibuat dengan elektroplating membran alumina (pori 200 nm) dengan perak untuk mendapatkan kontak listrik untuk elektrodeposisi selanjutnya. Setelah pelarutan membran dan penghilangan residu DNA yang diamobilisasi dengan penggabungan oligonukleotida bertiolasi terhadap dispersi 2 mL 0,1 mg batang mikro indium/emas selama 16 jam pada temperatur ruang. Deteksi dilakukan secara *solid-state derivative chronopotentiometric* dari batang indium mikrometer setelah pengumpulan magnetik pada SPE dilapisi merkuri yang sebelumnya dikondisikan selama 2 menit pada 1,8 V menggunakan magnet eksternal sebelum penempelan partikel/DNA. Hibrid yang terbentuk pada permukaan *magnetic bead* modifikasi streptavidin yang mengandung probe terbiotinilasi, diikuti dengan interaksi dengan target dan dengan oligonukleotida yang mengandung probe tambahan. Selanjutnya, pada saat terbentuk, penanda batang indium diukur 1 menit pra-kondisi pada -0,10 V. Penentuan dilakukan pada 1  $\mu$ A. Cara yang lain yang telah dilakukan adalah dengan melarutkan konjugat partikel *DNA-linked* dalam asam nitrat 6M dan memindahkan larutan ini ke dalam bufer asetat 100 mL. Penentuan dilakukan pada elektrode *carbon fiber* dilapisi merkuri. Dengan pengujian ini memungkinkan amplifikasi respons 5625 kali, dan menurunkan limit deteksi. Limit deteksi diperoleh sekitar 4 ng/L, atau 210 fM, atau 100 fg, atau 10 amol dalam 50  $\mu$ L larutan.

## DAFTAR PUSTAKA

- Alfonta, L., Singh, A., and Willner, I. 2001. Liposomes labeled with biotin and horseradish peroxidase: A probe for the enhanced amplification of antigen, antibody or oligonucleotide-DNA sensing processes by the precipitation of an in soluble product on electrode. *Anal. Chem.*, 73: 91–102.
- Bagel, O., Degrand, C., Limoges, B., Joannes, M., Azek, F., and Brossier, P. 2000. Enzyme affinity assays involving a single-use electrochemical sensor. Applications to the enzyme immunoassay of human chorionic gonadotropin hormone and nucleic acid hybridization of human cytomegalovirus DNA. *Electroanal.*, 12: 1447–1452.
- Cabig-Ciminska, M., Holmgren, A., Andresen, H., Bundving Barken, K., Wu`mpelmann, M., Albers, J., Hinstche, R., Breitenstein, A., Neubauer, P., Los, M., Czyz, A., Wegrzyn, G., Silfversparre, G., Ju`rgen, B., Schweder, T., and Enfors, S.-O. 2004. Electric chips for rapid detection and quantification of nucleic acids. *Biosen. Bioelectron.*, 19: 537–546.
- Campbell, C.N., Gal, D., Cristler, N., Banditrat, C., and Heller, A. 2002. Enzymeamplified amperometric sandwich test for RNA and DNA. *Anal. Chem.*, 74: 158–162.
- Compton, R.G. and Hancock, G. (Eds.) 1999. *Electrochemistry of DNA*. In Comprehensive Chemical Kinetics, Applications of Kinetic Modelling; Elsevier: Oxford, UK; Vol. 37.
- Domínguez, E., Rincón, O., and Narva´ez, A. 2004. Electrochemical DNA sensors base don enzyme dendritic architectures: an approach of enhanced sensitivity. *Anal.Chem.*, 76: 3132–3138.
- Egholm, M., Buchardt, O., Christensen, L., Behrens, C., Freier, S., Driver, D.A., Berg, R.H., Kim, S.K., Norden, B., and Nielsen, P.E. 1993. PNA hybridizes to complementary oligonucleotides obeying the Watson Crick hydrogen-bonding rules. *Nature.*, 365: 566–568.
- Erdem, A. and Ozsoz, M. 2001. Interation of the anticancer drug epirubicien with DNA. *Anal. Chim. Acta.*, 437: 107–114.
- Fan, C., Plazco, K.W., and Heeger, A.J. 2003. Electrochemical interrogation of conformational changes as a reagentless method for the sequence-specific detection of DNA. *PNAS*, 100: 9134–9137.

- Hashimoto, K., Ito, K., and Ishimori, Y. 1994a. Sequence-specific gene detection with a gold electrode modified with DNA probes and an electrochemically active dye. *Anal. Chem.*, 66: 3830–3833.
- Hashimoto, K., Ito, K., and Ishimori, Y. 1994b. Novel DNA sensor for electrochemical gene detection. *Anal. Chim. Acta.*, 286: 219–224.
- He, P. and Dai, L. 2004. Aligned carbon nanotube-DNA electrochemical sensors. *Chem. Comm.*, : 348–349.
- Johnston, D. and Thorp, H.H. 1996. Cyclic voltammetry studies of polynucleotide binding; oxidation by metal complexes: Homogeneous electron-transfer kinetics. *J. Phys. Chem.*, 100: 13837–13843.
- Ju, H.-X., Ye, Y.-K., Zhao, J.-H., and Zhu, Y.-L. 2003. Hybridization biosensor using di(2,2'-bipyridine)osmium (III) as electrochemical indicator for detection of polymerase chain reaction product of hepatitis B and virus DNA. *Anal. Biochem.*, 313: 255–261.
- Kara, P., Ozkan, D., Kerman, K., Meric, B., Erdem, A., and Ozsoz, M. 2002. DNA sensing on glassy carbon electrodes by using hemin as the electrochemical hybridization label. *Anal. Bioanal. Chem.*, 373: 710–716.
- Katz, E., Willner, I., and Wang, J. 2004. Electroanalytical and bioelectroanalytical systems based on metal and semiconductor nanoparticles. *Electroanal.*, 16: 19–44.
- Kawde, A.-N. and Wang, J. 2004. Amplified electrical transduction of DNA hybridization based on polymeric beads loaded with multiple gold nanoparticle tags. *Electroanal.*, 16: 101–107.
- Kelley, S.O., Barton, J.K., Jackson, N.M., and Hill, M.G. 1997. Electrochemistry of methylene blue bound to DNA-modified electrode. *Bioconj. Chem.*, 8: 31–37.
- Kerman, K., Ozkan, D., Kara, P., Meric, B., Gooding, J.J., and Ozsoz, M. 2002. Voltammetric determination of DNA hybridization using methylene blue and selfassembled alkanethiol monolayer on gold electrodes. *Anal. Chim. Acta.*, 462: 39–47.
- Kim, E., Kim, K., Yang, H., Kim, Y.T., and Kwak, J. 2003. Enzyme-amplified electrochemical detection of DNA using electrocatalysis of ferrocenyl-tethered dendrimer. *Anal. Chem.*, 75: 5665–5672.

- Krull, U.J., Nikolelis, D.P., Jantzi, S.C., and Zeng, J. 2000. Electrochemical detection of hybridization of DNA oligomers of mixed base sequence by surface-stabilized bilayer lipid. *Electroanal.*, 12: 921–925.
- Lippard, S.J. and Berg, J.M. 1994. *Principles of Bioinorganic Chemistry*; University Science Books: Mill Valley California.
- Liu, A. and Anzai, J. 2004. Use of polymeric indicator for electrochemical DNA sensors: Poly(4-vinylpyridine)derivative bearing [Os(5,6-dimethyl-1,10-phenanthroline)2Cl]2p. *Anal. Chem.*, 76: 2975–2980.
- Lucarelli, F., Marrazza, G., Palchetti, I., Cesaretti, S., and Mascini, M. 2002. Coupling of an indicator-free electrochemical DNA biosensor with polymerase chain reaction for the detection of NDA sequences related to the apolipoprotein E. *Anal. Chim. Acta.*, 469: 93–99.
- Lumley-Woodyear, T.de, Cambell, C.N., and Heller, A. 1996. Direct enzymeamplified electrical recognition of 30-base model oligonucleotide. *J. Am. Chem. Soc.*, 118: 5504–5505.
- Marrazza, G., Chianella, I., and Mascini, M. 1999. Disposable DNA electrochemical sensor for hybridization detection. *Biosens. Bioelectron.*, 14: 43–51.
- Marraza, G., Chiti, G., Mascini, M., and Anichini, M. 2000. Detection of human apolipoprotein E genotypes by DNA electrochemical biosensor coupled with PCR. *Clinical Chemistry.*, 46: 31–37.
- Maruyama, K., Motonaka, J., Mishima, Y., Matsuzaki, Y., Nakabayashi, I., and Nakabayashi, Y. 2001. Detection of target DNA by electrochemical method. *Sensor Actuat B. chem.*, 76: 215–219.
- Meric, B., Kerman, K., Ozkan, D., Kara, P., Erensoy, S., Akarca, U.S., Mascini, M., and Osos, M. 2002. Electrochemical DNA bisosensor for the detection of TT and Hepatitis B virus from PCR amplified real simples by using methylene blue. *Talanta*, 56: 837–846.
- Millan, K.M. and Mikkelsen, S.R. 1993. Sequence-selective biosensor for DNA based on hybridization indicators electroactive. *Anal. Chem.*, 65: 2317–2323.
- Miyahara, H., Yamashita, K., Kanai, M., Uchida, K., Takagi, M., Kondo, H., and Takenaka, S. 2002. Electrochemical analysis of single oligonucleotide polymorphisms of p53 gene. *Talanta.*, 56: 829–835.

- Napier, M.E. and Thorp, H. 1997a. Modification of electrodes with dicarboxylate self assembled monolayers for attachment and detection of nucleic acids. *Langmuir.*, 13: 6342–6344.
- Napier, M.E., Loomis, C.R., Sistare, M.F., Kim, J., Eckhardt, A.E., and Thorp, H.H. 1997b. Probing biomolecule recognition with electron transfer: electrochemical sensors for DNA hybridization. *Bioconjugate Chem.*, 8: 906–913.
- Neidle, S. 1994. DNA Structure and Recognition; IRL Press, Oxford University Press: Oxford. Nielsen, P.E., Egholm, M., Berg, R., and Buchard, O. 1991. *Science*, 254: 1497.
- Ontko, A.C., Armistead, P.M., Kircus, S.R., and Thorp, H.H. 1999. Electrochemical detection of single-stranded DNA using polymer-modified electrodes. *Inorg. Chem.*, 38: 1842–1846.
- Ozkan, D., Kara, P., Kerman, K., Meric, B., Erdem, A., Jelen, F., Nielsen, P.E., and Ozsoz, M. 2002. DNA and PNA sensing on mercury and carbon electrodes by using methylene blue as an electrochemical label. *Bioelectrochem.*, 58: 119–126.
- Palecek, E., Fojta, M., and Jelen, F. 2002c. New approaches in the development of DNA sensors: hybridization and electrochemical detection of DNA and RNA at two different surfaces. *Bioelectrochemistry*, 56: 85–90.
- Palecek, E., Billova, S., Havran, L., Kizek, R., Miculkova, A., and Jelen, F. 2002d. DNA hybridization at microbeads with cathodic stripping voltammetric detection. *Talanta*, 56: 919–930.
- Palecek, E., Kizek, R., Havran, L., Billova, S., and Fojta, M. 2002e. Electrochemical enzyme-linked immunoassay in a DNA hybridization sensor. *Anal. Chim. Acta.*, 469: 73–83.
- Park, S.-J., Taton, T.A., and Mirkin, C.A. 2002. Array-based electrical detection of DNA with nanoparticle probes. *Science.*, 295: 1503–1506.
- Patolsky, F., Lichtenstein, A., and Willner, I. 2001. Electronic transduction of DNA sensing processes on surfaces: Amplification of DNA detection and analysis of single-base mismatches by tagged liposomes. *J. Am. Chem. Soc.*, 123: 5194–5205.
- Patolsky, F., Weizmann, Y., Katz, E., and Willner, I. 2003. Magnetically amplified DNA assays (MADA): Sensing of viral DNA and single base mismatches

- using nucleic acid-modified magnetic particles. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 42: 2372–2376.
- Pividori, M.I., Merkoci, A., Barbe, J., and Alegret, S. 2003. PCR-genosensor rapid test for detecting salmonella. *Electroanalysis*, 15: 1815–1823.
- Rivas, G., Pedano, M.L., Ferreyra, N. 2005. Electrochemical biosensor for sequence-specific DNA detection. *Anal. Letters*, 38: 2653–2703
- Vagin, M.Y., Karyakina, E.E., Hianik, T., and Karyakin, A.A. 2003. Electrochemical transducers based on surfactant bilayers for the direct detection of affinity interactions. *Biosens. Bioelectron.*, 18: 1031–1037.
- Wang, J., Grant, D.H., Ozsoz, M., Cai, X., Tian, B., and Fernandes, J.R. 1997a. Adsorptive potentiometric stripping analysis of nucleic acids at mercury electrodes. *Anal. Chim. Acta.*, 349: 77–83.
- Wang, J., Fernandes, J.R., and Kubota, L.T. 1998a. Polishable and renewable DNA hybridization biosensors. *Electroanalysis.*, 70: 3699–3702.
- Wang, J., Rivas, G., Cai, X., Chicharro, M., Luo, D., Palecek, E., and Nielsen, P. 1997b. Adsorption and detection of peptide nucleic acids at carbon paste electrodes. *Electroanalysis.*, 9: 120–124.
- Wang, J., Cai, X., Fernandes, J.R., Grant, D.H., and Ozsoz, M. 1997c. Electrochemical measurements of oligonucleotides in the presence of chromosomal DNA using membrane-covered carbon electrodes. *Anal. Chem.*, 69: 4056–4059.
- Wang, J., Cai, X., Tian, B., and Shiraishi, H. 1996a. Microfabricated thick-film electrochemical sensor for nucleic acid determination. *Analyst*, 67: 965–969.
- Wang, J., Cai, X., Fernandes, J.R., Grant, D.H., and Ozsoz, M. 1998b. Carbon fiber microelectrodes for adsorptive stripping analysis of trace nucleic acids. *J. Electroanal. Chem.*, 441: 167–172.
- Wang, J., Rivas, G., Fernández, J.R., Lopez Paz, J.L., Jiang, M., and Waymire, R. 1998c. Indicator-free electrochemical DNA hybridization biosensor. *Anal. Chim. Acta.*, 375: 197–203.
- Wang, J., Cai, X., Rivas, G., Shiraishi, H., Farías, P.A.M., and Dontha, N. 1996b. DNA electrochemical biosensor for the detection of short DNA sequences related to the human immunodeficiency virus. *Anal. Chem.*, 68: 2629–2634.

- Wang, J., Rivas, G., Parrado, C., Cai, X., and Flair, M.N. 1997e. Electrochemical biosensor for detecting DNA sequences from the pathogenic protozoan *Cryptosporidium parvum*. *Talanta*, 44: 2003–2010.
- Wang, J., Zhang, X., Parrado, C., and Rivas, G. 1999a. Controlled release of DNA from carbon-paste microelectrodes. *Electrochem. Commun.*, 1: 197–202.
- Wang, J., Rivas, G., and Cai, X. 1997f. Screen-printed electrochemical hybridization biosensor for the detection of DNA sequences from *Escherichia coli* pathogen. *Electroanalysis*, 9: 395–398.
- Wang, J., Kawde, A.-N., and Musameh, M. 2003a. Carbon-nanotube-modified glassy carbon electrodes for amplified label-free electrochemical detection of DNA hybridization. *Analyst.*, 128: 912–916.
- Wang, J., Cai, X., Rivas, G., and Shiraishi, H. 1996c. Stripping potentiometric transduction of DNA hybridization processes. *Anal. Chim. Acta*, 326: 141–147.
- Wang, J., Cai, X., Rivas, G., Shiraishi, H., and Dontha, N. 1997g. Nucleic-acid immobilization, recognition and detection at chronopotentiometric DNA chips. *Biosens. Bioelectron.*, 12: 587–599.
- Wang, J., Rivas, G., Cai, X., Chicharro, M., Parrado, C., Dontha, N., Begleiter, A., Mowat, M., Palecek, E., and Nielsen, P.E. 1997h. Detection of point mutation in the p53 gene using a peptide nucleic acid biosensor. *Anal. Chim. Acta.*, 344: 111–118.
- Wang, J. and Kawde, A.-N. 2002a. Amplified label-free electrical detection of DNA hybridization. *Analyst.*, 127: 383–386.
- Wang, J. 2003. Nanoparticle-based electrochemical DNA detection. *Anal. Chim. Acta.*, 500: 247–257.
- Wang, J., Xu, D., Kawde, A.-N., and Polsky, R. 2001a. Metal nanoparticles-based electrochemical stripping potentiometric detection of DNA hybridization. *Anal. Chem.*, 73: 5576–5581.
- Wang, J., Polsky, R., and Xu, D. 2001b. Silver-enhanced colloidal gold electrochemical stripping detection of DNA hybridization. *Langmuir.*, 17: 5739–5741.

- Wang, J., Xu, D., and Polsky, R. 2002b. Magnetically-induced solid-state electrochemical detection of DNA hybridization. *J. Am. Chem. Soc.*, 124: 4208–4209.
- Wang, J., Liu, G., and Merkoç, i, A. 2003c. Particle-based detection of DNA hybridization using electrochemical stripping measurements of an iron tracer. *Anal. Chim. Acta.*, 482: 149–155.
- Wang, J., Rinco'n, O., Polsky, R., and Domínguez, E. 2003b. Electrochemical detection of DNA hybridization based on DNA-templated assembly of silver cluster. *Electrochem. Commun.*, 5: 83–86.
- Wang, J., Liu, G., Polsky, R., and Merkoç, i, A. 2002c. Electrochemical stripping detection of DNA hybridization based on cadmium sulfide nanoparticle tags. *Electrochem. Commun.*, 4: 722–726.
- Wang, J., Liu, G., Jan, M.R., and Zhu, Q. 2003c. Electrochemical detection of DNA hybridization based on carbon-nanotubes loaded with CdS tags. *Electrochem. Commun.*, 5: 1000–1004.
- Wang, J., Liu, G., and Merkoç, i, A. 2003d. Electrochemical coding technology for simultaneous detection of multiple DNA targets. *J. Am. Chem. Soc.*, 125: 3214–3215.
- Wang, J., Polsky, R., Merkoç, i, A., and Turner, K.L. 2003e. Electroactive beads for ultrasensitive DNA detection. *Langmuir*, 19: 989–991.
- Wang, J., Xu, D., Erdem, A., Polsky, R., and Salazar, M.A. 2002d. Genomagnetic electrochemical assays of DNA hybridization. *Talanta*, 56: 931–938.
- Wang, J., Kawde, A.-N., Musameh, M., and Rivas, G. 2002e. Dual enzyme electrochemical coding for detecting DNA hybridization. *Analyst*, 127: 1279–1282.
- Wang, J., Liu, G., and Jan, M.R. 2004. Ultrasensitive electrical biosensing of proteins and DNA: Carbon-nanotube derived amplification of the recognition and transduction events. *J. Am. Chem. Soc.*, 126: 3010–3011.
- Wang, J., Liu, G., and Zhu, Q. 2003f. Indium microrod tags for electrochemical detection of DNA hybridization. *Anal. Chem.*, 75: 6218–6222.
- Willner, I., Patolsky, F., Weizmann, Y., and Willner, B. 2002. Amplified detection of single-based mismatches in DNA using microgravimetric quartz-crystal microbalance. *Talanta*, 56: 847–856.

- Wu, K., Fei, J., Bai, W.W., and Hu, S. 2003. Direct electrochemistry of DNA, guanine and adenine at nanostructured film-modified electrode. *Anal. Biochem*, 376: 205–209.
- Xu, D., Huang, K., Liu, Z., and Ma, L. 2001. Microfabricated disposable DNA sensors based on enzymatic amplification electrochemical detection. *Electroanal.*, 13: 882–887.
- Zhang, Y., Kim, H.-H., and Heller, A. 2003. Enzyme-amplified amperometric detection of 3000 copies of DNA in a 10- $\mu$ L-droplet at 0.5 fM concentration. *Anal. Chem.*, 75: 3267–3269.
- Zhang, Y., Pothukuchy, A., Shin, W., Kim, Y., and Heller, A. 2004. Detection of  $10^3$  copies of DNA by an electrochemical enzyme-amplified sandwich assay with ambient O<sub>2</sub> as the substrate. *Anal. Chem.*, 76: 4093–4097.
- Zhu, N., Zhang, A., Wang, Q., He, P., and Fang, Y. 2004. Electrochemical detection of DNA hybridization using methylene blue and electro-deposited zirconia thin films on gold electrodes. *Anal. Chim. Acta.*, 510: 163–168.

## DAFTAR ISI

	<b>Halaman</b>
<b>DAFTAR ISI</b> .....	ii
<b>1. Disain Biosensor Hibridisasi Elektrokimia</b> .....	1
<b>2. Deteksi Terjadinya Hibridisasi</b> .....	3
2. 1. Berdasarkan signal redoks asam nukleat .....	3
2. 2. Berdasarkan penggunaan indikator redoks .....	5
2.2.1. Kompleks logam .....	5
2.2.2. Senyawa organik .....	11
2.3. Berdasarkan perubahan sifat listrik film .....	16
2.4. Berdasarkan penggunaan skema amplifikasi lain .....	17
2.5. Berdasarkan penggunaan permukaan yang berbeda untuk hibridisasi dan deteksi .....	24
2.5.1. Berdasarkan deteksi basa-basa secara elektrokimia .....	25
2.5.2. Berdasarkan pada deteksi partikel logam yang terikat pada hibrid .....	27
2.5.3. Berdasarkan pada deteksi marker redoks yang terjebak dalam <i>microstyrene bead</i> yang terikat pada hibrid .....	34
2.5.4. Berdasarkan deteksi produk enzimatis menggunakan enzim-enzim yang diikat terhadap hibrid .....	34
2.5.5. Berdasarkan metodologi lain .....	37
<b>DAFTAR PUSTAKA</b> .....	40

## DAFTAR GAMBAR

	<b>Halaman</b>
Gambar 1. Skema molekul DNA/RNA dan gula penyusunnya.....	1
Gambar 2. Basa-basa dalam asam nukleat .....	2
Gambar 3. Segmen pendek DNA/RNA .....	2
Gambar 4. Struktur <i>double helix</i> DNA.....	3
Gambar 5. Pasangan A-T dan C-G dalam DNA.....	4
Gambar 6. Skema biosensor afinitas berdasarkan lapisan DNA sebagai biopengenal .....	5
Gambar 7. Skema tahap analisis <i>adsorptive stripping DNA</i> .....	8
Gambar 8. Skema umum <i>chronopotentiometric stripping analysis</i> (PSA) .....	9
Gambar 9. Skema umum tahapan operasi suatu biosensor hibridisasi DNA secara elektrokimia .....	12
Gambar 10. Beberapa strategi amobilisasi oligonukleotida menggunakan probe untuk pengembangan biosensor hibridisasi berdasarkan DNA.....	13
Gambar 11. Amobilisasi DNA yang melibatkan kompleksasi avidin-biotin.....	17
Gambar 12. Amobilisasi dengan pengikatan kovalen pada elektrode karbon.....	19
Gambar 13. Amobilisasi dengan pengikatan kovalen pada elektrode emas dan platina.....	21
Gambar 14. Amobilisasi DNA secara adsorpsi elektrokimia.....	23
Gambar 15. Amobilisasi menggunakan polipirol terfungsionalisasi .....	30
Gambar 16. Struktur PNA dan DNA .....	32
Gambar 17. Sensor hibridisasi untuk deteksi urutan DNA HIV menggunakan $\text{Co(phen)}_3^{3+}$ sebagai indikator redoks.....	39

Gambar 18. (A) Sensing DNA target yang diamplifikasi dengan liposom (B) Sensing DNA target oligonukleotida terbiotinilasi.....	53
Gambar 19. Sensor DNA amperometri menggunakan oligonukleotida terfungsionalisasi.....	57
Gambar 20. Skema penggunaan dua permukaan untuk deteksi dan terjadinya hibridisasi .....	62
Gambar 21. Deteksi terjadinya hibridisasi berdasarkan <i>stripping</i> penanda logam....	67

## **DETEKSI HIBRIDISASI DALAM BIOSENSOR DNA ELEKTROKIMIA**



**Oleh:  
Yeni Wahyuni Hartati, M.Si  
NIP. 132 206 491**

JURUSAN KIMIA  
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
UNIVERSITAS PADJADJARAN  
BANDUNG  
2007

**DETEKSI HIBRIDISASI  
DALAM BIOSENSOR DNA ELEKTROKIMIA**

**Oleh:  
Yeni Wahyuni Hartati, M.Si  
NIP. 132 206 491**

Bandung, Agustus 2007  
Mengetahui,  
Ketua Jurusan Kimia  
FMIPA Unpad

Dr. Unang Supratman, M.S  
NIP. 131 929 930

## DAFTAR ISI

	<b>Halaman</b>
<b>DAFTAR ISI</b> .....	ii
<b>1. Biosensor dan Sifat Elektrokimia Asam Nukleat</b> .....	1
<b>2. Disain Biosensor Hibridisasi Elektrokimia</b> .....	6
2.1. Strategi .....	7
2.1.1. <i>Self-assembling</i> monolayer pada permukaan elektrode .....	7
2.1.2. Amobilisasi oligonukleotida terbiotinilasi pada permukaan modifikasi avidin .....	10
2.1.3. Pengikatan kovalen oligonukleotida terhadap permukaan derivatisasi .....	11
2.1.4. Akumulasi adsorptif oligonukleotida pada permukaan elektrode .....	14
2.1.5. Amobilisasi oligonukleotida melalui matrik polimer .....	22
2.2. Penggunaan probe lain .....	24
2.2.1. Dendrimer .....	24
2.2.5. Asam nukleat peptida ( <i>Peptide Nucleic Acid / PNA</i> ) .....	25
<b>DAFTAR PUSTAKA</b> .....	27

