

Biosensor Elektrokimia untuk Deteksi Urutan DNA Tanpa Indikator Hibridisasi

Yeni Wahyuni Hartati¹, S. Rochani², H. H. Bahti¹, M. Agha¹

¹Jurusan Kimia, FMIPA-Unpad, Jln Raya Bandung-Sumedang km 21 Jatinangor

²Pusat Penelitian dan Pengembangan Mineral dan Batubara, Bandung

yw_hartati@unpad.ac.id

Abstrak

Biosensor adalah suatu piranti yang memanfaatkan interaksi biologi untuk mendeteksi analit target. Suatu biosensor DNA (atau genosensor) menggunakan DNA yang diamobilisasi sebagai unsur pengenalnya. Biosensor DNA secara elektrokimia merupakan suatu elektrode yang mengkonversi pengenal pasangan basa menjadi sinyal listrik yang dapat diukur. Penelitian ini melaporkan suatu biosensor elektrokimia untuk mendeteksi urutan pendek DNA tanpa menggunakan indikator hibridisasi. Sensor berdasarkan amobilisasi probe 25-mer oligonukleotida dengan substitusi guanin-inosin dari DNA *Salmonella typhi* pada elektrode pasta karbon. Terjadinya hibridisasi antara urutan komplementer ditentukan dengan menggunakan sinyal guanin target, dideteksi secara voltametri pulsa diferensial. Faktor-faktor yang mempengaruhi amobilisasi dan hibridisasi dengan target dioptimasi untuk meningkatkan sensitivitas pengujian. Dengan waktu hibridisasi 20 menit, diperoleh limit deteksi pada level ng/ml DNA target.

Abstract

*Biosensor is a device that exploits biological interaction to detect target analyte. A DNA biosensor (or genosensors) employs an immobilized DNA as the recognized element. Electrochemical DNA biosensors rely on the conversion of the base-pair recognition event into a measurable analytical signal. An electrochemical biosensor for the detection of short DNA sequences without an external hybridization indicator is reported. The sensor relies on the immobilization of inosine-substituted (guanine-free) probe and hybridization of the 25-mer single-stranded oligonucleotide from the *Salmonella typhi* DNA sequence at carbon paste electrode. The extent of hybridization between the complementary sequences is determined by differential pulse voltametry. Numerous factors affecting the probe immobilization and target hybridization are optimized to maximize the sensitivity. Short (20 min) hybridization periods permit detection limit of ng/ml levels of the DNA target.*

Keywords: *Electrochemical DNA biosensor, Salmonella typhi, indicator free, inosine-substituted*

1. PENDAHULUAN

Biosensor DNA berdasarkan proses pengenalan asam nukleat berkembang pesat ke arah pengujian yang cepat terhadap penyakit infeksi maupun genetik. Transduser elektrokimia sering digunakan untuk mendeteksi terjadinya hibridisasi DNA, karena sensitivitasnya, dimensinya yang kecil dan biayanya yang tidak mahal [1]. Beberapa piranti melibatkan amobilisasi probe *single-stranded* (ss-) pada permukaan elektrode untuk mengenali pasangan basa komplementernya dalam larutan sampel. Pembentukan dupleks biasanya dideteksi dengan penggunaan indikator hibridisasi elektroaktif. Indikator biasanya menggunakan kompleks logam kationik (seperti $\text{Co}[\text{phen}]_3^{3+}$ atau $\text{Co}[\text{bpy}]_3^{3+}$ [2,3]) atau senyawa organik penginterkalasi (seperti *acridine orange* [4], *metilen blue* [5], dll.) yang berinteraksi dengan cara yang berbeda antara ss- dan ds-DNA. Respons

elektrokimia yang meningkat karena asosiasi indikator dengan permukaan dupleks kemudian berperan sebagai sinyal hibridisasi. Kompleks logam transisi (seperti $\text{Ru}[\text{bpy}]_2^{3+}$), memediasi elektrooksidasi basa guanin, juga telah digunakan oleh kelompok Thorp untuk mendeteksi terjadinya hibridisasi DNA [6].

Dalam paper ini kami melaporkan pengembangan biosensor elektrokimia untuk memonitor langsung hibridisasi DNA tanpa penggunaan indikator redoks eksternal. Metode ini berdasarkan pada sinyal DNA intrinsik, berkaitan dengan elektroaktivitas basa-basa asam nukleat [7,8]. Sebelumnya sensitivitas sinyal oksidasi guanin dari struktur DNA dimanfaatkan untuk mendeteksi pembentukan dupleks [9,10]. Dalam hal tertentu, penurunan respons guanin dari probe yang diamobilisasi ketika pembentukan dupleks pada permukaan digunakan untuk memonitor terjadinya hibridisasi. Bagaimanapun, karena pengukuran dari sinyal anodik yang menurun dari probe yang diamobilisasi adalah sangat terbatas, sehingga tidak

dapat digunakan untuk mendeteksi target yang mengandung basa guanin bebas. Karena keterbatasan ini maka untuk pengerjaan selanjutnya diatasi dengan penggunaan probe yang bebas guanin yaitu mengandung substituen inosin. Inosin dapat membentuk pasangan basa dengan residu sitosin target [7,10], tetapi sinyal oksidasinya dapat dibedakan dari respons guanin. Deteksi yang langsung dari hibridisasi DNA dapat diamati dengan munculnya sinyal oksidasi guanin.

2. METODE PENELITIAN

2.1. Alat

Potensiotstat metrohm 757 VA computrace, dengan sel elektrokimia 3 elektrode (elektrode pembanding Ag/AgCl (KCl 3 M), elektrode pembantu platina, dan elektrode kerja karbon pasta.

2.2. Bahan

DNA probe mengandung substituen inosin 25-mer, DNA target 25-mer (Research Biolabs, Singapura), natrium klorida, natrium fosfat, kalium fosfat, natrium asetat, dan kalium klorida (eMerck), bubuk grafit (Fluka), *mineral oil* (Sigma), asam asetat glasial, air bidestilasi steril, tip pipet, dan peralatan gelas lainnya. Larutan stok dibuat dengan konsentrasi 1000 µg/ml. Peralatan gelas yang digunakan disterilisasi menggunakan *autoclave* selama 15 menit

2.3. Preparasi elektrode

Pasta karbon dibuat dengan cara mencampurkan bubuk grafit dengan *mineral oil* dengan perbandingan massa 70:30. Permukaan elektrode dihaluskan menggunakan kertas timbang sebelum digunakan. Badan elektrode kerja adalah teflon dengan diameter internal 6 mm. Kontak listrik menggunakan batang stainless steel.

2.4 Prosedur

Tiap pengukuran melibatkan siklus amobilisasi, hibridisasi, deteksi, pada permukaan pasta karbon yang baru dibuat. Semua percobaan dilakukan pada temperatur ruang.

Tahapan prosedur:

Pretreatment elektrode. Elektrode pasta karbon diaktivasi secara elektrokimia pada potensial 1,6 V selama 1 menit dalam larutan bufer asetat 0,5 M pH 5 yang mengandung NaCl 20 mM, dengan pengaliran gas nitrogen.

Amobilisasi probe. Probe yang mengandung substituen inosin diamobilisasi pada elektrode pasta karbon yang telah dipretreatment secara adsorpsi sederhana, selama 20 menit. Elektrode yang telah dimodifikasi kemudian dicuci selama 5 detik dengan bufer asetat salin.

Hibridisasi. Elektrode yang telah dimodifikasi probe ditetesi 15 µg /ml target, selama waktu hibridisasi yang dioptimasi, kemudian dicuci dengan bufer fosfat salin selama 5 detik.

Transduksi voltametri. Sinyal oksidasi guanin diukur setelah memindahkan elektrode ke dalam larutan blanko bufer asetat, diukur secara voltametri pulsa diferensial, dengan daerah selusur +0,50 sampai dengan +1,50 V.

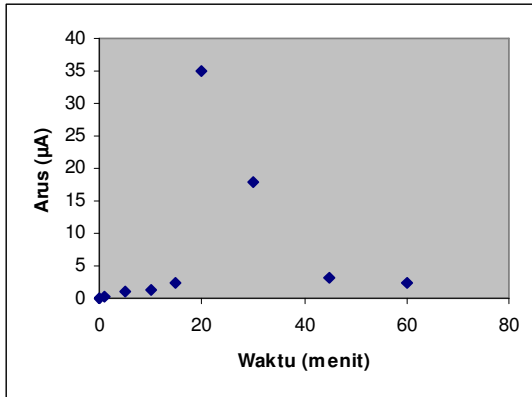
3. HASIL DAN PEMBAHASAN

Teknik voltametri pulsa diferensial telah digunakan untuk menguji biosensor hibridisasi tanpa indikator. Dalam penelitian ini, pertama-tama dilakukan amobilisasi secara adsorpsi terhadap 25-mer oligonukleotida yang merupakan urutan spesifik bakteri patogen *Salmonella typhi* [11], pada permukaan elektrode pasta karbon. Maksud amobilisasi dan pengujian ini adalah untuk mengamati sifat elektrokimia dari oligonukleotida yang diselusur pada daerah potensial +0,50 - +1,50 V. Selanjutnya dilakukan amobilisasi probe 25-mer oligonukleotida yang mengandung substituen inosin, sebanyak konsentrasi yang sama. Dalam material berbasis karbon, DNA terutama distabilisasi pada permukaan transduser dengan interaksi elektrostatis melalui muatan negatif *backbone* gulafosfat dengan basa-basa yang berorientasi terhadap larutan [12].

Dengan tiga kali pengulangan pengukuran secara voltametri pulsa diferensial, voltamogram urutan DNA target yang mengandung enam buah basa guanin dan tiga buah basa inosin menunjukkan adanya puncak oksidasi guanin pada daerah +1,02 V dan adenin pada daerah +1,20 V, terhadap elektrode pembanding Ag/AgCl (KCl 3 M). Puncak-puncak ini berdekatan dengan hasil kelompok penelitian yang telah menggunakan pasta karbon sebagai transduser, yaitu puncak guanin pada daerah +1,01 dan adenin pada +1,20 V vs. Ag/AgCl [7,13]. Perbandingan tinggi puncak sekitar 2:1 untuk guanin dan adenin. Sedangkan voltamogram probe menunjukkan adanya puncak adenin, tanpa guanin. Puncak inosin terdeteksi pada daerah sekitar +0,80 V, sedangkan hasil penelitian Wang dkk. (1998) yang menunjukkan adanya puncak oksidasi inosin pada daerah +0,77 V.

Secara umum, tertutupnya permukaan elektrode dengan probe (dan juga meminimalisasi adsorpsi nonspesifik) adalah bergantung pada konsentrasi probe dan waktu adsorpsi [7]. Untuk optimalisasi adsorpsi probe pada percobaan ini permukaan elektrode diuji menggunakan larutan probe dengan konsentrasi dari rentang 1 – 120 µg/ml dengan waktu adsorpsi 5 – 60 menit (Gbr 1). Hasil yang paling baik adalah menggunakan 20 µg/ml probe dengan waktu adsorpsi 20 menit, dilihat dari tinggi respons dan interferensi nonspesifik. Dengan larutan probe ini, puncak guanin meningkat dari 5 hingga 20 menit, dan kemudian menurun kembali. Hal ini menunjukkan bahwa permukaan elektrode telah tertutup penuh dengan penotolan 15 µl, 20 µg/ml. Amobilisasi lebih dari 20 menit besarnya arus puncak menurun,

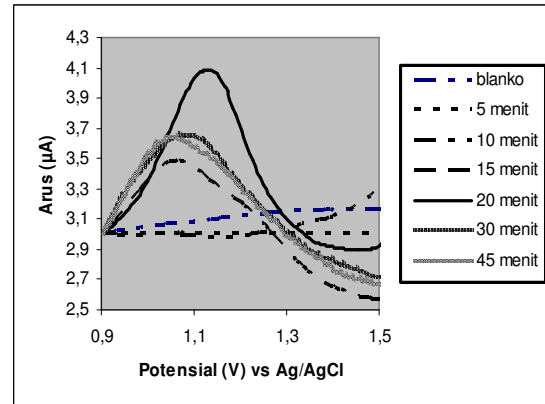
kemungkinan disebabkan adsorpsi non spesifik yang menempel tidak dapat lepas kembali dengan pencucian bufer asetat selama 5 detik. Konsentrasi probe yang digunakan selanjutnya adalah 20 µg/ml dan ditotolkan sebanyak 15 µl.



Gbr 1. Perbandingan tinggi arus puncak terhadap waktu amobilisasi probe. Konsentrasi probe 20 µg/ml. Pretreatment: 1 menit pada 1,6 V dalam larutan buffer asetat 0,5 M, pH 5,0 mengandung NaCl 20 mM.

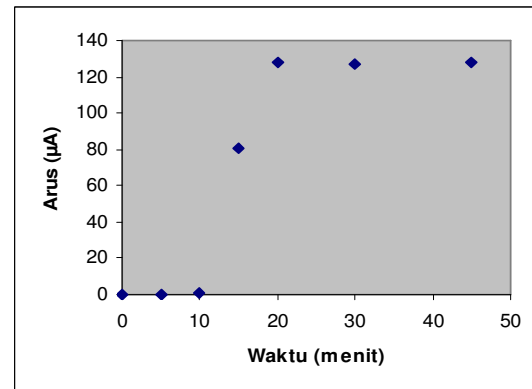
Sinyal hibridisasi guanin sangat dipengaruhi oleh pretreatment permukaan elektrode pasta karbon. Tanpa pretreatment, sinyal guanin tidak tampak, sehingga dilakukan pretreatment secara elektrokimia selama satu menit pada potensial +1,60 V (atau potensial yang lebih tinggi hingga +1,80 V). Probe yang diamobilisasi terikat kuat terhadap permukaan yang ditreatment, ditunjukkan dengan tidak adanya penurunan intensitas puncak guanin setelah mencelupkannya pada blanko bufer asetat.

Gambar 2 menunjukkan voltamogram untuk elektrode yang dimodifikasi dengan 15 µl probe dengan konsentrasi 20 µg/ml, dan dihibridisasikan dengan 15 µl target dengan konsentrasi 20 µg/ml dengan beberapa waktu hibridisasi (1 sampai dengan 45 menit). Dari grafik terlihat bahwa puncak guanin mulai teramati setelah waktu hibridisasi 15 menit, artinya pembentukan dupleks dapat terdeteksi. Berbeda dengan penggunaan indikator redoks, akan teramati sinyal baru yang muncul dari indikator [2,3], deteksi hibridisasi tanpa indikator hanya mengamati apakah terdapat sinyal guanin atau tidak. Dan pada Gambar 3 menunjukkan plot tinggi puncak terhadap waktu hibridisasi. Sinyal hibridisasi meningkat secara linier terhadap waktu hibridisasi dari mulai 10 -20 menit. Setelah lebih dari 20 menit cenderung tetap, hal ini menunjukkan hibridisasi telah menutupi permukaan elektrode. Optimasi waktu hibridisasi diperlukan untuk meminimalisasi efek adsorpsi non spesifik [7].

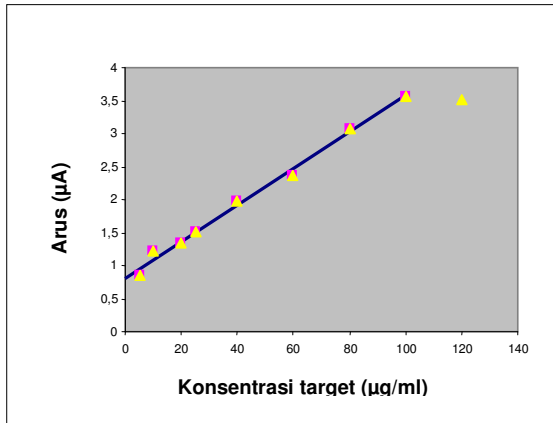


Gbr 2. Voltamogram untuk waktu hibridisasi 5, 10, 15, 20, 30, dan 45 menit menggunakan 15 µl probe 20 µg/ml, dengan 15 µl target 20 µg/ml. Kondisi lainnya seperti pada Gbr 1.

Gambar 4 menunjukkan kurva kalibrasi yang diperoleh dengan strategi bebas indikator dengan waktu adsorpsi probe 20 menit, dan waktu hibridisasi 20 menit. Probe yang diamobilisasi sebanyak 15 µl dengan konsentrasi 20 µg/ml. Sinyal hibridisasi guanin naik secara linier dengan konsentrasi DNA target *S. typhi* 0 µg/ml hingga 100 µg/ml, dengan koefisien regresi 0,997. Limit deteksi menggunakan elektrode ini diperoleh 35,86 ng/ml.



Gbr 3. Perbandingan tinggi arus puncak terhadap waktu hibridisasi. Kondisi lainnya seperti pada Gbr 1.



Gbr 4. Kurva kalibrasi sinyal oksidasi guanin terhadap konsentrasi DNA target *S. Typhi* pada tahap hibridisasi. Probe yang diamobilisasi 20 µg/ml, waktu hibridisasi 20 menit. Kondisi lain seperti pada Gbr 1.

4. KESIMPULAN

Suatu biosensor elektrokimia untuk deteksi urutan DNA yang berkaitan dengan bakteri patogen *S. typhi* telah berhasil didemonstrasikan. Transduser yang digunakan adalah elektrode pasta karbon. Deteksi terjadinya hibridisasi DNA tanpa indikator eksternal, dengan memanfaatkan proses oksidasi guanin target. Salah satu keuntungannya adalah dengan mengamati sinyal redoks DNA intrinsik untuk memonitor terjadinya hibridisasi, tanpa adanya sinyal baru seperti pada halnya menggunakan indikator eksternal. Dengan tanpa indikator eksternal, akan cocok untuk dicobakan pada transduser karbon lain dan terhadap urutan DNA lain.

Dalam penelitian ini belum dilakukan pengujian terhadap urutan DNA non spesifik, dengan menggunakan urutan DNA lain. Dengan demikian untuk penelitian selanjutnya akan dilakukan pengujian nonspesifik dan pengujian terhadap sampel secara langsung.

UCAPAN TERIMAKASIH

Penulis mengucapkan terimakasih kepada Direktorat Jendral Pendidikan Tinggi atas dana yang diberikan melalui Hibah Bersaing XIV, No. 013/SP3/PP/DP2M/II/2006. Terima kasih juga disampaikan kepada Dr. Muktiningsih Nurjayadi atas diskusi tentang *S. typhi*.

DAFTAR ACUAN

- [1] Wang, J., Cai, X., Rivas, G., Shiraishi, H., and Dontha, N. 1997. Nucleic-acid immobilization, recognition and detection at chronopotentiometric DNA chips. *Biosens. Bioelectron.*, 12: 587–599.
- [2] Millan, K.M. and Mikkelsen, S.R. 1993. Sequence-selective biosensor for DNA based on hybridization indicators electroactive. *Anal. Chem.*, 65: 2317–2323.
- [3] Wang, J., Rivas, G., and Cai, X. 1997. Screen-printed electrochemical hybridization biosensor for the detection of DNA sequences from *Escherichia coli* pathogen. *Electroanalysis*, 9: 395–398.
- [4] Hashimoto, K., Ito, K., and Ishimori, Y. 1994. Novel DNA sensor for electrochemical gene detection. *Anal. Chim. Acta.*, 286: 219–224.
- [5] 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.
- [6] 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.
- [7] Wang, J., Rivas, G., Fernández, J.R., Lopez Paz, J.L., Jiang, M., and Waymire, R. 1998. Indicator-free electrochemical DNA hybridization biosensor. *Anal. Chim. Acta.*, 375: 197–203.
- [8] Wang, J., Cai, X., Wang, J., Jonsson, C., and Palecek, E. 1995a. Trace Measurements of RNA by potentiometric stripping analysis at carbon paste electrodes. *Anal. Chem.*, 67: 4065–4070.
- [9] Wang, J., Cai, X., Tian, B., and Shiraishi, H. 1996. Microfabricated thick-film electrochemical sensor for nucleic acid determination. *Analyst*, 67: 965–969
- [10] Erdem, E, Pividori, M.I, Manel del Valle, Alegret, S. 2004. Rigid carbon composites: a new transducing material for label-free electrochemical genosensing. *J. Electr. Chem.* 567:29–37
- [11] Rudiretna, A., Noor.A.S., Liang O.B., 1997. Gene *carA Salmonella typhi*. Gene Bank, No akses AF012246
- [12] Palecek, E., Fojta, M., Tomschick, M., and Wang, J. 1998. Electrochemical biosensors for DNA hybridization and DNA damage. *Biosens. Bioelectrons.*, 13: 621–628
- [13] Ozkan, D.,A. Erdem, P. Kara, K. Kerman, B. Meric, J. Hassmann, M. Ozsoz, 2002. *Anal. Chem.* 74:5931.

