

DETEKSI URUTAN OLIGONUKLEOTIDA *Mycobacterium tuberculosis* SECARA VOLTAMMETRI MENGGUNAKAN SCREEN PRINTED CARBON ELECTRODE (SPCE)

Yeni Wahyuni Hartati, Yohan, Ratna Nurmalasari, Shabarni Gaffar, Rubianto A. Lubis

Departmen Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Padjadjaran, 45363 Jatinangor, Jawa Barat, Indonesia

*Alamat Korespondensi: yeni.w.hartati@unpad.ac.id

Abstrak: *Mycobacterium tuberculosis* merupakan bakteri penyebab tuberkulosis (TB). Pengembangan analisis secara biosensor DNA sangat menarik perhatian karena penerapannya mudah. Dalam penelitian ini telah dilakukan penentuan urutan pendek oligonukleotida *M. tuberculosis* gen RV0508 dari strain H37RV secara voltametri pulsa differensial menggunakan *screen printed carbon electrode* (SPCE). Pendeteksian berdasarkan teknik hibridisasi urutan oligonukleotida probe yang diadsorpsi pada permukaan SPCE, dengan pasangan komplementernya dari DNA target, tanpa indikator hibridisasi, yaitu dengan mensubstitusi basa guanin probe dengan basa inosin. Respon hibridisasi berupa signal guanin DNA target di daerah potensial sekitar +0,9 V. Telah diperoleh korelasi linear antara arus puncak dengan konsentrasi DNA target pada rentang 5,0-20,0 µg/mL dengan batas deteksi 8,2 µg/mL.

Kata kunci: *M. tuberculosis*, SPCE, biosensor DNA, voltametri

Abstract: *Mycobacterium tuberculosis* is the bacterium that causes tuberculosis (TB). Development of DNA biosensor analysis is very interesting because its application is easy. In this research has done the determination of short oligonucleotide sequences *M. tuberculosis* RV0508 gene of the strains H37RV by differential pulse voltammetric methods using screen printed carbon electrodes (SPCE). Detection based on hybridization of oligonucleotide probe sequences are adsorbed on the surface of SPCE, with its complementary pair of target DNA, without hybridization indicator, by substituting guanine base with inosine of probe. Response of hybridization was found as a signal of the target DNA guanine in the area of a potential of about +0.9 V. The linear correlation between peak current with the target DNA concentration was achieved in the range of 5.0-20.0 µg/mL with a detection limit of 8.2 µg/mL.

Keywords: *M. tuberculosis*, SPCE, DNA biosensor, voltammetry

PENDAHULUAN

Tuberkulosis (TB) merupakan penyakit penyebab kematian dan menduduki posisi kedua setelah HIV banyak terjadi terutama di negara berkembang (Hamdan *et al.* 2012; Zhou 2011). Oleh karena itu, diagnosis secara langsung, sederhana, sensitif dan spesifik dapat membantu untuk mengisolasi pasien dan mengontrol penyakit tersebut.

Beberapa metode analisis yang telah dikembangkan untuk diagnosis bakteri *M. tuberculosis* yaitu metode tuberkulosis skin test, berdasarkan pemurnian protein derivatif (Reyes *et al.* 2011; Stavri *et al.* 2004), kultur bakteri, radioimmunoassay (Kardival *et al.* 2000), *polymerase chain reaction* (PCR), *real time* PCR, ELISA (Abdelwahab 2010), piezoelectric (Kaewphinit *et al.* 2010), mikroskopi, multi-antigen print immunoassay, mikrokantilever berdasarkan kit diagnostik (Sangeetha *et al.* 2014). Berbagai jenis masalah yang dihadapi dalam melakukan diagnosis TB dalam sampel klinis, dua diantaranya adalah penggunaan senyawa kimia berbahaya seperti cahaya UV dan etidium bromida yang bersifat mutagen selama melakukan elektroforesis gel agarosa (pada saat karakterisasi amplikon PCR). Selain itu, penggunaan instrumen yang mahal seperti *real time*-PCR

memerlukan keahlian khusus dalam pengoperasiannya, dan juga membutuhkan reagen kimia yang cukup mahal seperti pewarna hijau SYBR dan Taqman (Yean *et al.* 2008; Hamdan *et al.* 2012).

Di antara berbagai metode untuk deteksi DNA, teknik elektrokimia memiliki beberapa kelebihan seperti: sederhana, waktu analisis yang singkat, relatif murah, sensitivitas tinggi, dan cocok untuk pengembangan perangkat portabel (Jin *et al.* 2013), juga dapat mensubstitusi metode elektroforesis, sehingga tidak menggunakan senyawa karsinogenik. Selain itu, transduser elektrokimia telah banyak dikembangkan untuk mendeteksi terjadinya hibridisasi DNA, karena sensitivitasnya tinggi, dimensinya kecil, dan biayanya tidak mahal (Wang *et al.* 1997).

Telah dilakukan deteksi *M. tuberculosis* melalui biosensor DNA secara voltametri pulsa diferensial dengan menggunakan elektrode emas melalui teknik *self assembly monolayer* (Nurmalasari *et al.* 2015). Penelitian lainnya dilakukan Hamdan *et al.* (2012) menggunakan elektrode grafit pensil dan metilen biru untuk mendeteksi *M. tuberculosis* secara biosensor elektrokimia. Pemilihan elektrode dalam metode voltametri merupakan hal yang sangat penting. Salah satu elektrode yang menawarkan beberapa

keuntungan yaitu ramah lingkungan, ukuran elektrode lebih kecil sehingga dapat dipasang dengan potensiostat yang portabel dan dapat dikembangkan menjadi miniaturisasi biosensor yaitu *screen printed carbon electrode* (SPCE). Penggunaan SPCE untuk deteksi *M. tuberculosis* telah dikembangkan dengan penggunaan indikator metilen biru (Issa *et al.* 2010). Dari hasil penelitian tersebut menunjukkan bahwa biosensor elektrokimia merupakan metode yang sederhana, sensitif dan ekonomis untuk mendeteksi *M. tuberculosis*.

Dalam penelitian ini, kami melakukan deteksi *M. tuberculosis* menggunakan SPCE dengan teknik deteksi hibridisasi tanpa indikator, yaitu hanya mengamati elektroaktivitas intrinsik dari asam nukleat, yaitu dengan mengamati sinyal oksidasi dari basa guanin DNA target. Teknik ini tidak memerlukan waktu yang lama dalam pengerjaannya dan merupakan strategi deteksi hibridisasi yang lebih mudah diterapkan dibandingkan dengan teknik lainnya, seperti penggunaan indikator atau modifikasi-modifikasi lain untuk mendeteksi terjadinya hibridisasi.

BAHAN DAN METODE

Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain ssDNA probe (5'-IAC III CAA TCC AII IC-3') dimana basa guanin (G) diganti dengan basa inosin (I), ssDNA target (5'- GCC CTG GAT TGC CCG TC -3'), ssDNA non komplementer (5'-GAG CTG TGA AAT TTG GTG CC-3') (First base, Singapore). Urutan DNA probe dan target ini dirancang berdasarkan strain H37RV gen Rv0508 dalam *M. tuberculosis*. ssDNA larutan stok (100 µg/mL) dilarutkan dengan larutan bufer asetat 0,5 M pH 5,0 mengandung 0,02 M NaCl, bufer fosfat 0,1 M pH 7,0, akuabides, dan pure H₂O grade PCR.

Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain Voltametri Diffensial Pulsa (VDP) dilakukan dengan menggunakan Metrohm® µAutolab tipe III potensiostat terhubung ke PC dilengkapi dengan software NOVA 1.7. Sel elektrokimia sistem tiga-elektrode terdiri dari elektrode kerja SPCE (Dropsens), elektrode referensi Ag/AgCl KCl 3,0 M dan elektrode bantu platina. autoclave, pH meter, biophotometer plus Eppendorf®, oven, pipet mikro, sentrifugasi, avometer YX-360 TR, sonikator, tabung mikro, tip pipet, vortex, dan alat-alat gelas yang umum digunakan di laboratorium.

Karakterisasi SPCE Secara Voltametri Siklik

Elektrode di-pretreatment dengan cara diberikan potensial +1,4 V selama 1 menit dan dikeringkan beberapa menit, kemudian dicuci dengan akuabides. Untuk karakterisasi elektrode; ditetesi larutan 0,01 M K₄[Fe(CN)₆]/0,1 M KCl pada suhu ruang (25°C) dan dipindai pada potensial -0,8 sampai 0,6 V.

Amobilisasi ssDNA probe

Elektrode yang telah di-pretreatment kemudian ditetesi 20 µL ssDNA probe yang dilarutkan dalam buffer asetat 0,5 M pH 5,0 mengandung NaCl 0,02 M. Waktu amobilisasi dan konsentrasi divariasikan untuk mendapatkan pengukuran optimal. Semua pengukuran dilakukan pada suhu ruang (25°C).

Hibridisasi Probe-Target Sintesis dan Kurva Standar

Elektrode yang telah diamobilisasi dengan ssDNA probe pada permukaan elektrode dibilas dengan buffer asetat 0,5 M pH 5,0 mengandung NaCl 0,02 M, dan kemudian elektrode ditetesi dengan ssDNA target sintesis berbagai variasi konsentrasi. Variasi waktu hibridisasi juga dilakukan, dan semua pengerjaan dilakukan pada suhu ruang (25°C).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Karakterisasi SPCE Secara Voltametri Siklik

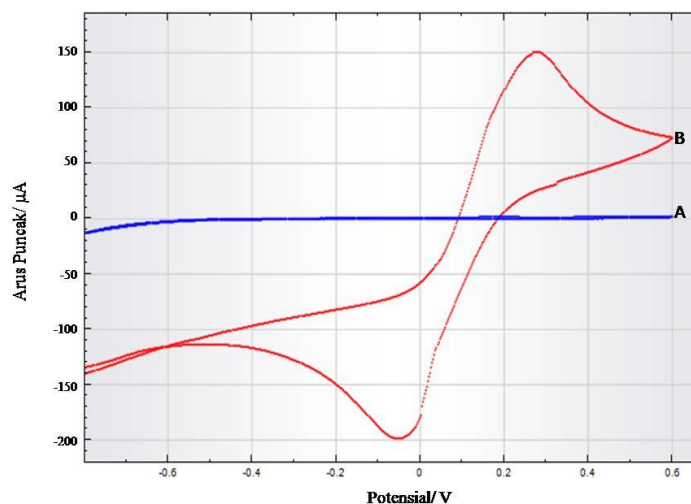
Untuk mempelajari sifat permukaan SPCE dilakukan secara voltametri siklik (Bard & Faulkner, 2000), dengan mengamati aktivitas reduksi-oksidasi dari spesi elektroaktif seperti [Fe(CN)₆]³⁻ dengan tiga kali pengulangan. Pemindaian diterapkan pada potensial -0,8 V sampai +0,6 V, dengan laju pindai 50 mV/s. Gambar 1 memperlihatkan voltammogram siklik dari SPCE ditetesi 10mM K₃Fe(CN)₆ yang mengandung 0,1 M KCl. Puncak oksidasi dan reduksi dari pengukuran tiga kali [Fe(CN)₆]³⁻ selalu tetap yaitu berturut-turut pada daerah sekitar +0,3 V dan -0,15 V vs Ag/AgCl. Hal ini menunjukkan SPCE memberikan reproduibilitas yang baik. Sedangkan SPCE ditetesi buffer asetat 0,1 M pH 5,0 yang digunakan sebagai larutan blanko tidak memberikan puncak oksidasi dan reduksi pada rentang -0,8 V sampai dengan +0,6 V.

Optimasi pengukuran

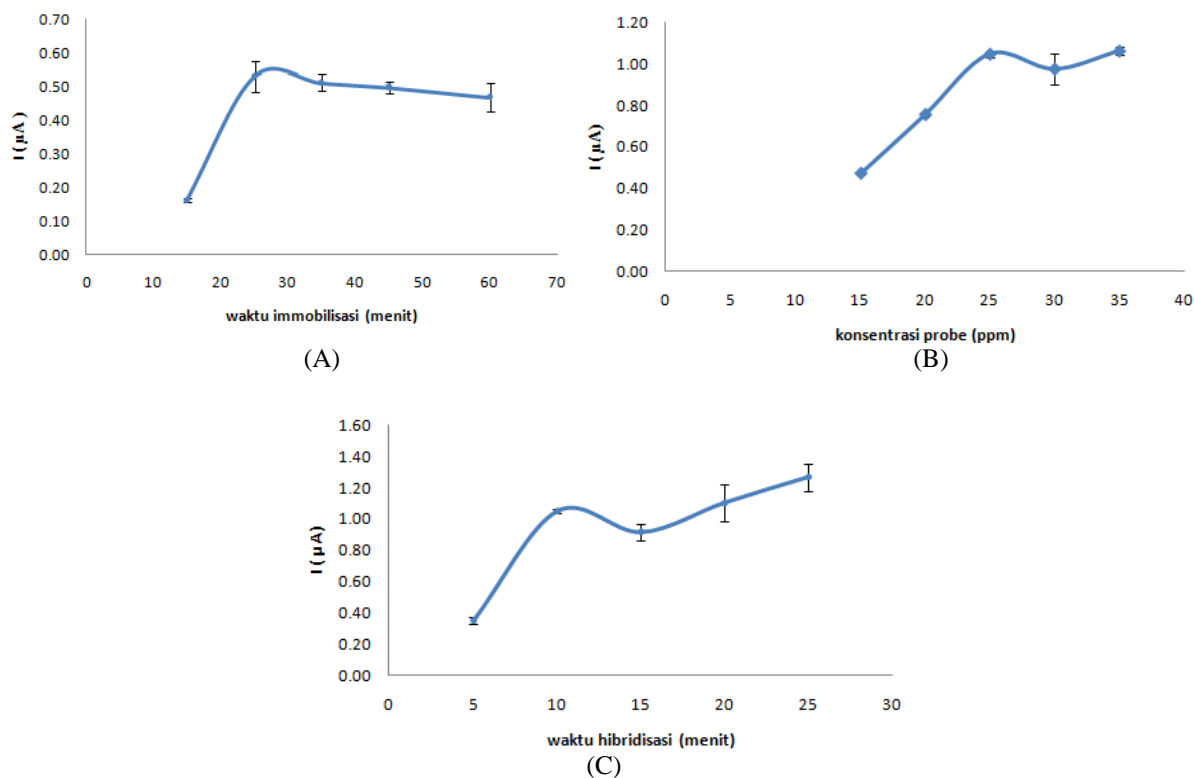
Pada penelitian ini pengamatan dilakukan pada signal hibridisasi DNA probe-target yang berupa oksidasi guanin melalui metode voltametri pulsa diferensial. Arus puncak oksidasi guanin menggunakan elektrode grafit dapat diamati pada daerah potensial sekitar 0,9 V vs Ag/AgCl (KCl 3,0 M) (Hartati *et al.* 2016).

DNA probe diamobilisasi pada permukaan SPCE secara adsorpsi sederhana, dengan waktu amobilisasi yang dioptimasi. Demikian pula halnya dengan banyaknya konsentrasi DNA probe yang diamobilisasi, dan waktu hibridisasi probe-target, juga dioptimasi. Hasil optimasi ditunjukkan pada Gambar 2.

Adsorpsi merupakan metode amobilisasi yang sangat sederhana dimana DNA probe dapat diikat tanpa ada modifikasi probe dengan molekul lain. Semakin maksimal probe teradsorpsi maka semakin meningkat signal namun pada batas tertentu semakin banyak DNA probe yang terdepresiasi juga



Gambar 1. Voltammogram siklis (A) SPCE dengan buffer asetat 0,1 M pH 5,0; (B) SPCE dalam 0,01 M $K_3Fe(CN)_6$ yang mengandung 0,1 M KCl. Laju pemindaian 50 mV/s.

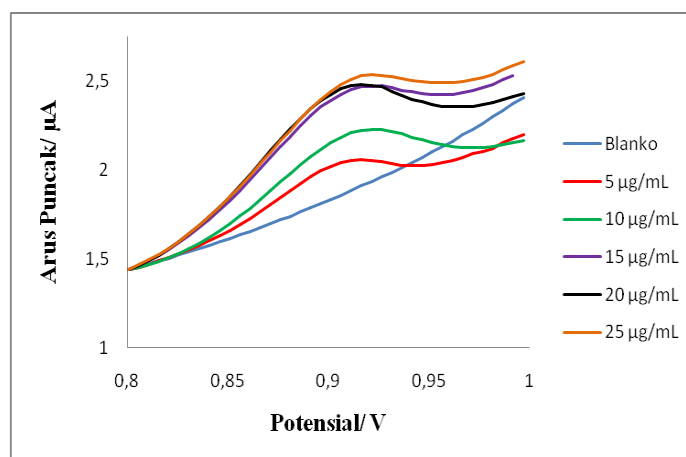


Gambar 2. Optimasi sinyal guanin dalam larutan bufer asetat 0,5 M pH 5,0, (A). Pengaruh waktu amobilisasi terhadap signal guanin, (B). Pengaruh konsentrasi DNA probe (C). Pengaruh waktu hibridisasi DNA probe-target

memperkecil signal guanin, dimungkinkan karena terjadi penumpukan dan interaksi sesama DNA probe yang menutupi permukaan elektrode. Maka penting untuk melakukan pencucian dengan pelarutnya dan menemukan waktu yang sesuai untuk memperkuat signal guanin.

Pengaruh waktu terhadap amobilisasi pada penelitian ini dilakukan pada konsentrasi DNA probe

10 µg/mL, DNA target 25 µg/mL, dan waktu hibridisasi selama 10 menit. Dari Gambar 2.A, dapat dilihat bahwa terjadinya peningkatan signal dengan variasi waktu amobilisasi dan hasil optimum amobilisasi dicapai pada waktu amobilisasi 25 menit. Waktu amobilisasi merupakan proses yang penting karena DNA memerlukan waktu untuk berikatan dengan karbon melalui adsorpsi.



Gambar 3. Voltammogram DPV signal guanine target dari hasil hibridisasi DNA *probe* 25 µg/mL dengan DNA target 0, 5, 10, 15, 20 dan 25 µg/mL.

Penentuan konsentrasi probe optimum dilakukan dengan memvariasikan konsentrasi probe 15, 20, 25, 30, dan 35 µg/mL dalam larutan buffer asetat 0,5 M pH 5,0 yang mengandung NaCl 0,02 M. Gambar 2.B menunjukkan arus puncak mencapai 1,03 µA pada konsentrasi probe 25 µg/mL, dimana sebelumnya setiap peningkatan DNA probe 5 µg/mL mengalami kenaikan arus sekitar 0,28 µA. Kemudian terjadi penurunan arus puncak pada konsentrasi 30 µg/mL menjadi 0,96 µA, dan pada konsentrasi 35 µg/mL terjadi kenaikan arus kembali pada nilai yang hampir sama untuk konsentrasi 25 µg/mL. Hal ini kemungkinan disebabkan karena konsentrasi DNA probe pada permukaan SPCE sudah jenuh, sehingga penambahan konsentrasi yang semakin tinggi sudah tidak menyebabkan kenaikan arus yang lebih tinggi lagi. Untuk percobaan selanjutnya digunakan konsentrasi DNA probe 25 µg/mL.

Gambar 2.C menunjukkan hasil percobaan optimasi waktu hibridisasi dilakukan variasi waktu yaitu 5, 10, 15, 20, dan 25 menit. Dari grafik terlihat waktu optimum ditunjukkan pada waktu hibridisasi 10 menit yang menghasilkan arus puncak 1,05 µA terjadi peningkatan secara signifikan dibandingkan hibridisasi selama 5 menit.

Kurva Kalibrasi dan Penentuan Batas Deteksi

Dalam menentukan linieritas dan batas deteksi dibuat sederetan konsentrasi oligonukleotida target 0 µg/L sampai 25 µg/L dalam larutan bufer fosfat 0,1 M pH 7,0. Voltammogram pulsa diferensial ditunjukkan pada Gambar 3, dimana dengan bertambahnya konsentrasi ssDNA target terjadi kenaikan arus puncak.

Linieritas konsentrasi oligonukleotida target dengan tinggi arus puncak dihasilkan pada rentang konsentrasi antara 5,0 sampai 20,0 µg/mL. Sedangkan konsentrasi oligonukleotida target 25 µg/mL berada di luar persamaan garis, setelah dilakukan perhitungan uji-*t*. Hasil *t*-hitung 4,88,

sedangkan *t*-tabel 3,18, maka konsentrasi 25 µg/mL tidak masuk ke dalam persamaan linieritas.

Persamaan garis untuk kurva kalibrasi diperoleh $Y=0,0229X + 0,0548$. Selanjutnya dihitung secara statistika untuk pengujian *slope* dan intersep pada taraf kepercayaan 95%, diperoleh persamaan yang melewati titik nol, yaitu $Y=0,027 X$, dengan $R^2=0,93$. Dari perhitungan diperoleh RSD 7,2%, dan batas deteksi berdasarkan kurva kalibrasi diperoleh 8,2 µg/mL.

Issa *et al.* (2010) melakukan pendeteksian oligonukleotida *M. tuberculosis* dengan penggunaan indikator elektroaktif metilen biru melaporkan nilai RSD 8,61%. Kelebihan tanpa penggunaan indikator terutama dalam mempersingkat waktu analisis dan pengamatan pada potensial intrinsik DNA target, tanpa mengamati daerah potensial oksidasi atau reduksi senyawa indikator elektroaktif.

KESIMPULAN

Proses deteksi oligonukleotida *M. tuberculosis* tanpa indikator hibridisasi ini didasarkan pada sinyal oksidasi guanin yang muncul pada potensial sekitar +0,9 V. Guanin pada untai ssDNA probe diganti dengan inosin sehingga sensor akan memberikan arus puncak jika terhibridisasi dengan DNA target strain H37RV gen Rv0508.

Ucapan Terima Kasih

Penelitian ini didanai Hibah Penelitian Unggulan Perguruan Tinggi Unpad 2014.

DAFTAR PUSTAKA

- Abdelwahab, A.E. (2010). Immunological and molecular diagnosis of *Mycobacterium tuberculosis* between two environmentally different regions. *Current Research in Tuberculosis*. 1(1): 1-8.
- Bard, A.J. & Faulkner, L.R. (2000). *Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications*. 2nd ed. John Wiley & Sons, Inc. New York.

- Hamdan N.A., Issa, R., Noh, M.F.M. & Zin, N. M. (2012). Electrochemical technique using methylene blue with pencil graphite electrode for optimum detection of *Mycobacterium tuberculosis* DNA. *Current Research in Tuberculosis*. 4(1): 1-12.
- Hartati, Y.W., Wyantuti, S., Firdaus, M.L., Surbakti, R., Auliany, N., Gaffar, S. (2016). A rapid and sensitive diagnosis of typhoid fever based on nested PCR-voltammetric DNA biosensor using flagellin gene fragment. *Indonesian Journal of Chemistry*. 16(1):87-91.
- Issa, R., Hamdan, N.A. & Noh, M.F.M. (2010). Differential pulse voltammetric determination of DNA hybridization using methylene blue on screen printed carbon electrode for The detection of *Mycobacterium tuberculosis*. *Biotechnology*. 9(3): 304-311.
- Jin, H., Wei, M. & Wang, J. (2013). Electrochemical DNA biosensor based on the BDD nanoglass array electrode. *Chemistry Central Journal*. 7(1): 65-71.
- Kaewphinit, T., Santiwatanakul, S., Promptmas, C. & Chansiri, K. (2010). Detection of non-amplified mycobacterium tuberculosis genomic DNA-based biosensors. *Sensors*. 10(3): 1846-1858
- Kardival, G.V., Kameswaran, M. & Ray, M.K. (2000). Radioimmunoassay antibody detection in pulmonary tuberculosis. *Indian Journal of Tuberculosis*. 47(2): 97-100.
- Nirmalasari, R., Yohan, Gaffar, S., Hartati, Y.W. (2015). Label-Free Electrochemical DNA biosensor for the detection of *Mycobacterium tuberculosis* using gold electrode modified by self-assembled monolayer of thiol. *Procedia Chemistry*. 17: 111-117
- Reyes, C.M.A., Sanchez, L., Ong-Lim, A.L. & Gonzales, M.L.M. (2011). A paired comparison of tuberculin skin test result in children with clinical manifestations of tuberculosis using 2 TU and 5 TU tuberculins. *PIDSP Journal*. 12(2): 56-66
- Sangeetha, P. & Juliet, A.V. (2014). Simulation and analysis of mikro cantilever sensor for enhanced biosensing of disease of causing pathogens. *International Journal of Engineering Development and Research*. 5(1): 131-136.
- Stavri, H., Bucurenci, N., Ulea, I., Costache, A., Popa, L., Popa, M.I. (2012). Use of recombinant purified protein derivative (PPD) antigens as specific skin test for tuberculosis. *Indian Journal of Medical Research*. 136(5): 799-807.
- Wang, J., Cai, X., Rivas, G., Shiraishi, H. & Dontha, N. (1997). Nucleic-acid immobilization, recognition and detection at chronopotentiometric DNA chips. *Biosensors and Bioelectronics*. 12(7): 587-599.
- Yean, C.Y., Kamarudin, B., Ozkan, D.A., Yin, L.S., Lalitha, P., Ismail, A., Ozsoz, M. & Ravichandran, M. (2008). Enzyme-linked amperometric electrochemical genosensor assay for detection of PCR amplicon on a streptavidin-treated screen printed carbon electrode. *Analytical Chemistry*. 80(8): 2774-2779.
- Zhou, L., He, X., He, D., Wang, K. & Qin, D. (2011). Biosensing Technologies for mycobacterium tuberculosis detection: Status and new developments. *Clinical and Developmental Immunology*. 2011: 193963.