

Bioanalisis Berasaskan Sistem Glutamat Dehidrogenase-Diaporase untuk Pengesanan Ammonium

(Bioanalysis Based on Glutamate Dehydrogenase/diaphorase System
for Ammonium Determination)

NUR ELLINA AZMI, JAAFAR ABDULLAH*, MUSA AHMAD, LEE YOON HENG,
HAMIDAH SIDEK & SAMSULIDA ABD RAHMAN

ABSTRAK

Bioanalisis bagi pengesanan ammonium berdasarkan penggunaan sistem dua enzim Glutamat dehidrogenase-Diaporase (GLDH-Dph) dan reagen tiazolil biru tetrazolium bromida (MTT) diterangkan. Dalam kajian ini, GLDH memangkinkan tindak balas penukaran asid α -ketoglutarik membentuk L-glutamat dan kofaktor β -nikotinamida adenina dinukleotida (NADH) akan dioksidakan kepada NAD^+ dengan kehadiran ammonium. Seterusnya, baki NADH yang tidak digunakan dioksidakan kepada NAD^+ oleh Dph dan MTT dan diturunkan kepada formazan yang berwarna ungu. Keamatan formazan yang terbentuk dicerap menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 563 nm. Bioanalisis ini memberikan rangsangan yang optimum bagi pengesanan ammonium pada pH larutan penimbil fosfat bersamaan 8, kepekatan GLDH, Dph dan reagen MTT pada 13.2 unit/mL, 1.17 unit/mL dan 0.2 mM, masing-masing. Bioanalisis ini memberikan rangsangan linear terhadap ammonium dalam julat kepekatan 3 - 50 μM dengan had pengesanan 1 μM .

Kata kunci: Ammonium; bioanalisis; Dph; GLDH

ABSTRACT

Bioanalysis for ammonium detection based on dual enzyme system Glutamate dehydrogenase/ Diaphorase (GLDH-Dph) and thiazolyl blue tetrazolium bromide (MTT) reagent has been described. In this work, GLDH will catalyze the conversion of α -ketoglutaric acid to L-glutamate and β -nicotinamide adenine dinucleotide (NADH) will be oxidized to NAD^+ in the presence of ammonium. The excess of unreacted NADH was then oxidized to NAD^+ by Dph and MTT reagent was reduced to purple color formazan. The intensity of formazan product formed was observed at the wavelength of 563 nm by using spectrophotometer. Bioanalysis showed optimum response for ammonium detection at phosphate buffer of pH 8, GLDH, Dph and MTT concentrations at 13.2 unit/mL, 1.17 unit/mL and 0.2 mM, respectively. Bioanalysis showed linear response towards ammonium in the concentration range of 3 - 50 μM with the detection limit of 1 μM .

Keywords: Ammonium; bioanalysis; Dph; GLDH

PENGENALAN

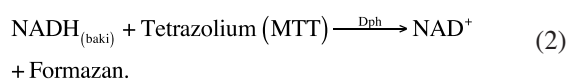
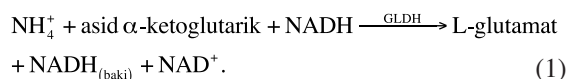
Ammonia adalah sebatian yang mengandungi unsur nitrogen dan hidrogen dengan formula NH_3 . Ammonia wujud sebagai gas yang tidak berwarna pada suhu atmosfera serta memberi bau yang tajam. Ammonia mudah larut di dalam air dan membentuk ion yang dikenali sebagai ammonium. Ia adalah antara penyumbang kepada masalah pencemaran dalam alam sekitar. Di antara sumber pencemaran ammonium ialah air sisa kumbahan domestik, tapak pelupusan sampah dan ladang penternakan. Selain itu, penggunaan baja kimia secara berlebihan bagi penyuburan tanah dalam aktiviti pertanian turut menyebabkan pencemaran ammonium. Secara semula jadi, ammonium boleh terhasil dengan kehadiran bakteria *Azobacter* di dalam tanah. Bagaimanapun kehadiran bakteria ini akan menyumbang kepada pembebasan ammonia secara berlebihan dalam persekitaran. Keadaan tanah yang berasid juga menyebabkan ammonia yang berlebihan ditukarkan kepada ammonium (Timmer et al. 2005).

Kehadiran ammonium yang tinggi dalam alam sekitar boleh memberi kesan negatif terhadap keseimbangan ekologi (Lau et al. 2004). Ammonium yang berlebihan dalam air secara langsung akan menyebabkan keadaan *hypoxia* iaitu pengurangan kadar oksigen dalam air. Ini menyebabkan kecederaan terhadap hati, insang dan ginjal organisma akuatik dan meningkatkan kadar kematian ikan (Kwan et al. 2005). Ammonium juga boleh memberi impak yang negatif terhadap kesihatan manusia pada kepekatan yang tinggi seperti kegagalan fungsi buah pinggang dan hati serta jangkitan terhadap sistem penghadaman (Dubas & Pimpan 2008; Zougar et al. 2008). Oleh sebab itu, pengesanan kehadiran ammonium dalam alam sekitar adalah amat penting.

Pelbagai kaedah telah digunakan bagi pengesanan ammonium dalam air di antaranya ialah kaedah Berthelot (Lau et al. 2004; Martinez et al. 2005), kaedah Nessler (Ghauch et al. 1999) dan analisis suntikan aliran (Boer et al. 1994). Walau bagaimanapun, penggunaan teknik ini

memerlukan masa rawatan sampel yang panjang dan rumit. Ia juga melibatkan peralatan yang agak mahal.

Dalam kajian ini, pengesanan ammonium secara semi kuantitatif menggunakan sistem dua enzim GLDH-Dph dengan gabungan reagen MTT sebagai penunjuk berwarna dilaporkan. Dengan kehadiran ammonium, GLDH memangkinkan tindak balas penukaran asid α -ketoglutarik membentuk L-glutamat dan kofaktor (NADH) akan dioksidakan kepada NAD^+ (Persamaan 1). Seterusnya, baki NADH yang berlebihan akan dioksidakan kepada NAD^+ oleh Dph dan MTT diturunkan kepada formazan yang berwarna ungu. Keamatan produk formazan yang terbentuk daripada tindak balas boleh dicerap menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 563 nm (Persamaan 2). Didapati produk formazan yang terhasil daripada tindak balas adalah berkadar songsang dengan kepekatan ammonium yang hadir dalam kajian ini. Ciapetti et al. (1992) turut melaporkan cerapan warna ungu bagi tindak balas penurunan MTT kepada formazan oleh sel yang aktif secara metabolisme:



BAHAN DAN KAEDAH

BAHAN KIMIA DAN PENYEDIAAN LARUTAN

Bahan yang digunakan dalam kajian ini ialah reagen tiazolil biru tetrazolium bromida, MTT (Sigma); glutamate dehidrogenase, GLDH (Fluka); Diaporase, Dph (Sigma); NADH (Sigma) dan asid α -ketoglutarik (Fluka). Larutan enzim disediakan dengan melarutkan GLDH atau Dph menggunakan larutan penimbal fosfat pH8. Reagen MTT pula disediakan dengan melarutkan reagen tersebut di dalam air suling. Kesemua larutan penimbal yang digunakan adalah pada kepekatan 50 mM.

TATAKAEDAH BIOANALISIS

Tatakaedah bioanalisis pengesanan ammonium adalah berdasarkan kajian terdahulu (Yamaguchi et al. 2005) dengan sedikit modifikasi. 0.15 mM reagen MTT, 0.15 mM NADH, 0.15 mM asid α -ketoglutarik, 3.3 unit/mL GLDH dan larutan ammonium pada kepekatan yang berbeza (150 μM dan 3000 μM), dicampurkan ke dalam kuvet yang mengandungi larutan penimbal fosfat dengan isipadu akhir 1 mL. Campuran dibiarkan bertindak balas selama 4 minit. Kemudian 0.78 unit/mL Dph ditambahkan kepada campuran tersebut. Selepas 1 minit, nilai serapan direkodkan. Kajian aktiviti bioanalisis ditetapkan pada panjang gelombang 563 nm seperti persamaan (3):

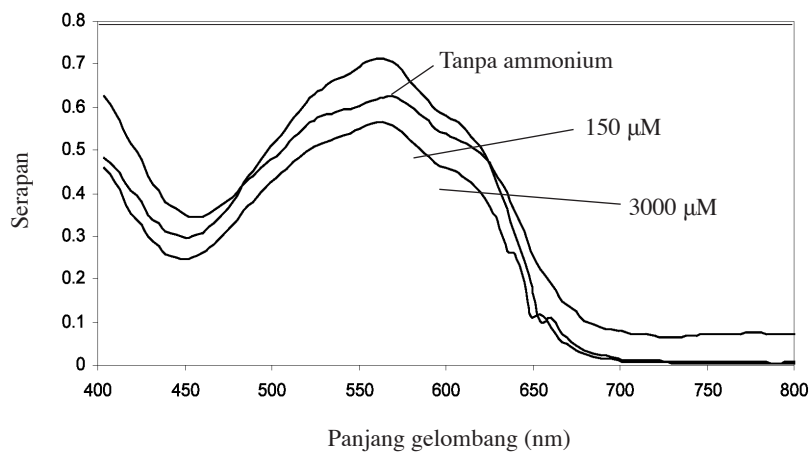
$$\Delta A = A_0 - A_1, \quad (3)$$

dengan ΔA , A_0 , A_1 ialah nilai perbezaan serapan, nilai serapan tanpa ammonium dan nilai serapan ammonium pada kepekatan tertentu ($X \mu\text{M}$), masing-masing. Semua pencirian dilakukan dengan menggunakan spektrofotometer UL-nampak model Varian Cary 50.

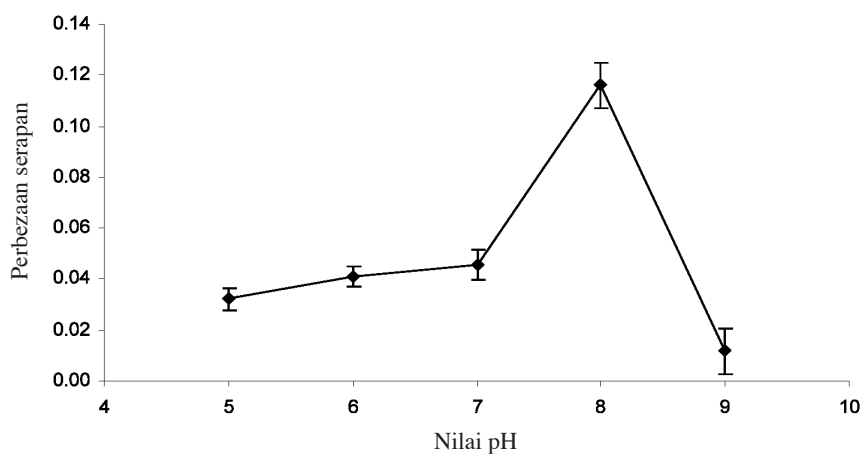
KEPUTUSAN DAN PERBINCANGAN

Pencirian bagi melihat potensi penggunaan sistem dua enzim GLDH-Dph dengan gabungan MTT untuk pengesanan ammonium dilakukan dengan mengkaji beberapa parameter untuk memastikan analisis dapat dijalankan pada kadar yang maksima. Rajah 1 menunjukkan spektrum serapan tindak balas penurunan MTT kepada formazan pada kepekatan ammonium yang berbeza dengan kehadiran GLDH-Dph. Peningkatan kepekatan ammonium menyebabkan nilai serapan menurun kerana pembentukan warna formazan pada panjang gelombang 563 nm yang semakin berkurang. Ini membuktikan bahawa penghasilan formazan adalah berkadar songsang dengan kepekatan ammonium yang hadir di dalam sistem tersebut. Pemerhatian yang hampir sama juga telah dilaporkan sebelum ini oleh Watanabe et al. (2005) yang melaporkan penggunaan MTT dalam biosensor bagi mengukur kesegaran ikan pada panjang gelombang 565 nm. Bagi memastikan sistem dua enzim GLDH-Dph bertindak balas pada aktiviti optimum, kajian kesan pH larutan penimbal turut dilakukan. Keputusan menunjukkan nilai perbezaan serapan meningkat dengan peningkatan pH larutan penimbal. Didapati serapan optimum diperolehi pada pH8 seperti dalam Rajah 2. Pada nilai pH melebihi 8, nilai beza serapan didapati menurun. Ini disebabkan aktiviti enzim direncatkan pada pH yang tinggi. Pada pH yang berasid pula didapati mendakan berwarna putih terbentuk. Ini mungkin disebabkan oleh enzim dinyahaktifkan pada medium yang berasid. Pengesanan ammonium dalam kajian ini pula adalah berdasarkan kajian Thornton et al. (2007), dan pada pH asidik sehingga pH8, ammoniakal nitrogen kebiasaannya akan wujud dalam keadaan berion atau dikenali sebagai ammonium. Manakala pada pH berkali melebihi pH8, ammoniakal nitrogen akan wujud dalam keadaan tidak berion atau dikenali sebagai ammonia.

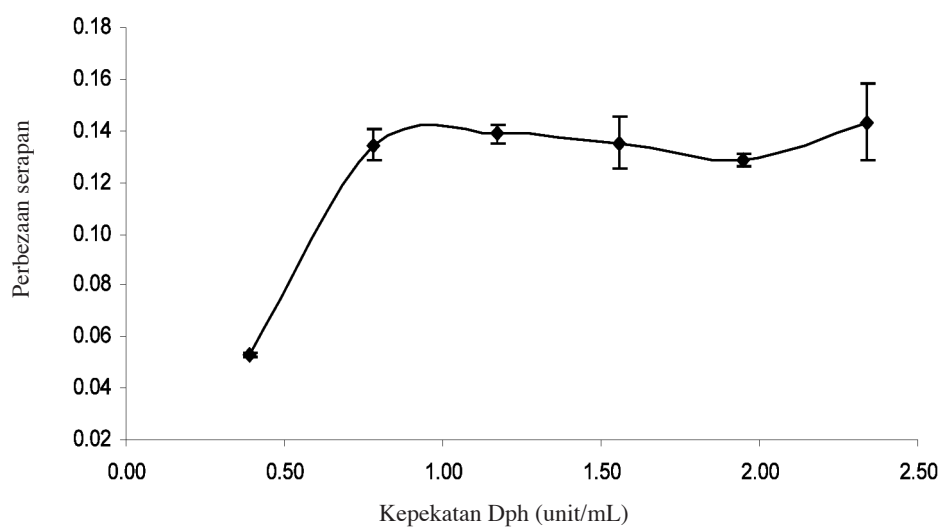
Kesan kepekatan enzim turut dikaji bagi mendapatkan pengesanan ammonium yang optimum. Rajah 3 menunjukkan kesan kepekatan Dph terhadap tindak balas pengesanan ammonium. Dalam kajian ini kepekatan Dph yang digunakan adalah dalam julat 0.39 – 2.34 unit/mL manakala GLDH telah ditetapkan pada 3.3 unit/mL. Manakala, reagen MTT, asid α -ketoglutarik dan NADH ditetapkan pada kepekatan 0.15 mM, 0.15 mM dan 0.15 mM, masing-masing. Keputusan menunjukkan perbezaan serapan yang maksima dicerap pada kepekatan Dph bersamaan 1.17 unit/mL. Pada kepekatan Dph melebihi 1.17 unit/mL, didapati perbezaan serapan mencapai keadaan malar menunjukkan aktiviti enzim mencapai tahap tepu. Kajian kesan kepekatan GLDH dalam pengesanan ammonium telah dilakukan dengan mempelbagaikan



RAJAH 1. Spektrum serapan tindak balas penurunan MTT kepada formazan pada kepekatan ammonium yang berbeza (150 µM dan 3000 µM) dalam julat panjang gelombang 400 – 800 nm



RAJAH 2. Kesan pH terhadap tindak balas enzim GLDH-Dph bebas pada panjang gelombang 563 nm (n = 3)

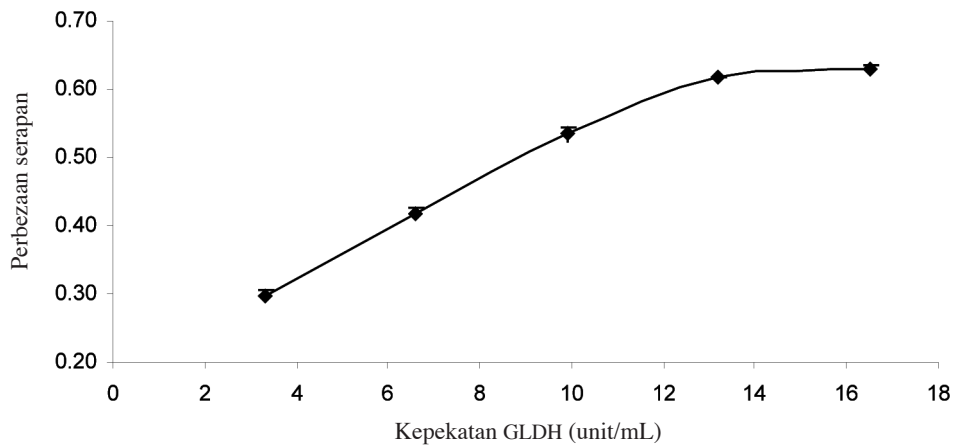


RAJAH 3. Kesan kepekatan enzim Dph yang dicirap pada panjang gelombang 563 nm (n = 3)

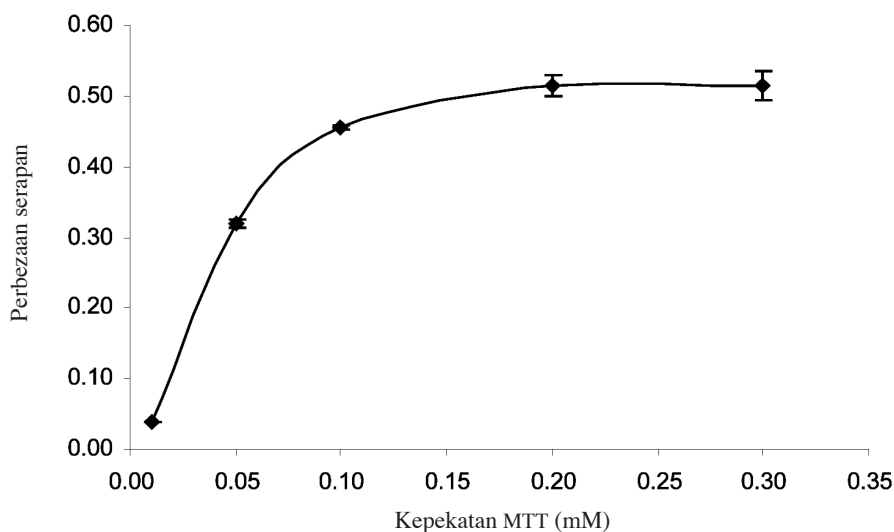
kepekatan dalam julat di antara 3.3 – 16.5 unit/mL. Dalam kajian ini, kepekatan Dph ditetapkan pada 1.17 unit/mL. Kepekatan NADH, MTT dan asid α -ketoglutarik masing-masingnya ditetapkan pada 0.15 mM, 0.15 mM, 0.15 mM. Rajah 4 menunjukkan peningkatan perbezaan serapan apabila kepekatan GLDH ditingkatkan. Didapati nilai maksima diperolehi pada kepekatan GLDH bersamaan 13.2 unit/mL. Profil kesan kepekatan GLDH yang hampir sama juga dilaporkan dalam kajian sebelum ini (Ellina et al. 2009).

Rajah 5 menunjukkan hasil kajian kesan kepekatan MTT terhadap pengesanan ammonium. Peningkatan kepekatan MTT menyebabkan perbezaan serapan turut meningkat. Perbezaan serapan yang ketara ditunjukkan pada kepekatan MTT 0.2 mM. Pada kepekatan MTT melebihi 0.2 mM, perbezaan serapan menjadi malar. Ini kerana semua NADH dalam sistem tersebut telah dioksidakan

menjadi NAD⁺. Analisis kesan kepekatan kofaktor NADH turut dilakukan dengan mempelbagaikan kepekatan di antara 0.05 hingga 0.25 mM. Kajian ini dilakukan pada kepekatan ammonium 0 mM dan 0.1 mM. Kepekatan reagen MTT dan asid α -ketoglutarik masing-masingnya ditetapkan pada 0.2 mM dan 0.15 mM. Keputusan menunjukkan perbezaan serapan meningkat dengan peningkatan kepekatan NADH. Perbezaan serapan yang optimum dicerap pada kepekatan NADH bersamaan 0.15 mM (Rajah 6). Apabila kepekatan NADH melebihi 0.15 mM, nilai perbezaan serapan didapati menurun. Pemerhatian ini setanding dengan kajian yang dilaporkan oleh penyelidik sebelum ini (Odman et al. 1994). Menurut Odman (1994) kehadiran NADH pada kepekatan yang terlalu tinggi akan merencat aktiviti enzim. Rajah 7 pula menunjukkan kesan kepekatan asid α -ketoglutarik terhadap pengesanan ammonium dengan menggunakan sistem GLDH-Dph



RAJAH 4. Kesan kepekatan enzim GLDH terhadap tindak balas pengesanan ammonium pada panjang gelombang 563 nm (n = 3)

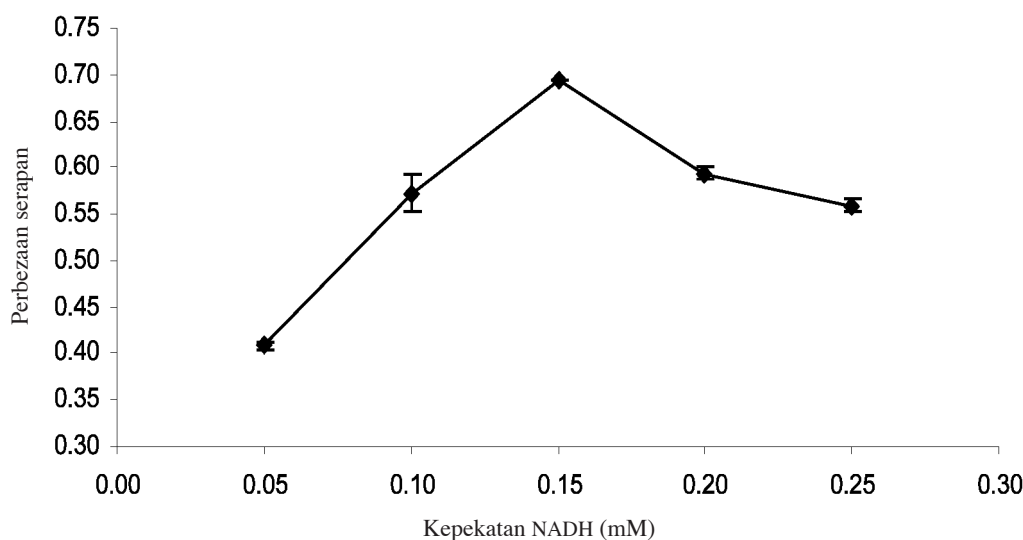


RAJAH 5. Kesan kepekatan reagen MTT yang berbeza (0.01 – 0.3 mM) terhadap tindak balas pengesanan ammonium (n = 3)

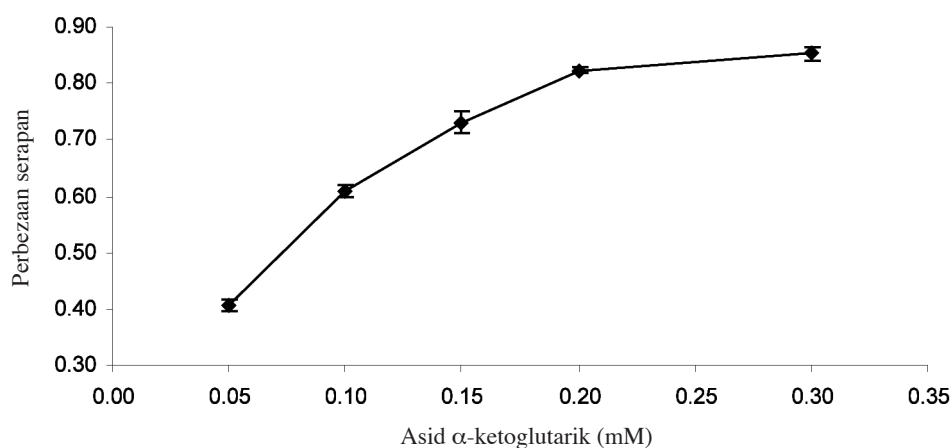
bebas. Dalam kajian ini kepekatan ammonium, MTT dan NADH yang digunakan masing-masingnya ditetapkan pada 0.1 mM, 0.2 mM dan 0.15 mM. Peningkatan perbezaan serapan didapati berkadar terus dengan peningkatan kepekatan asid α -ketoglutarik. Perbezaan serapan yang maksimum dicerap apabila kepekatan asid α -ketoglutarik mencapai 0.2 mM. Perbezaan serapan didapati malar apabila kepekatan asid α -ketoglutarik ditingkatkan melebihi 0.2 mM. Pemerhatian yang hampir sama bagi kajian kepekatan asid α -ketoglutarik turut dilaporkan oleh Kwan et al. (2005) dengan kajian pengesanan ammonium dengan menggunakan gabungan glutamat dehidrogenase dan glutamat oxidase.

Kajian julat kepekatan dinamik dilakukan bagi melihat tindak balas larutan GLDH-Dph bebas terhadap kepekatan ammonium yang berbeza pada keadaan yang optimum. Kepekatan ammonium dipelbagaikan dalam julat 0.0 –

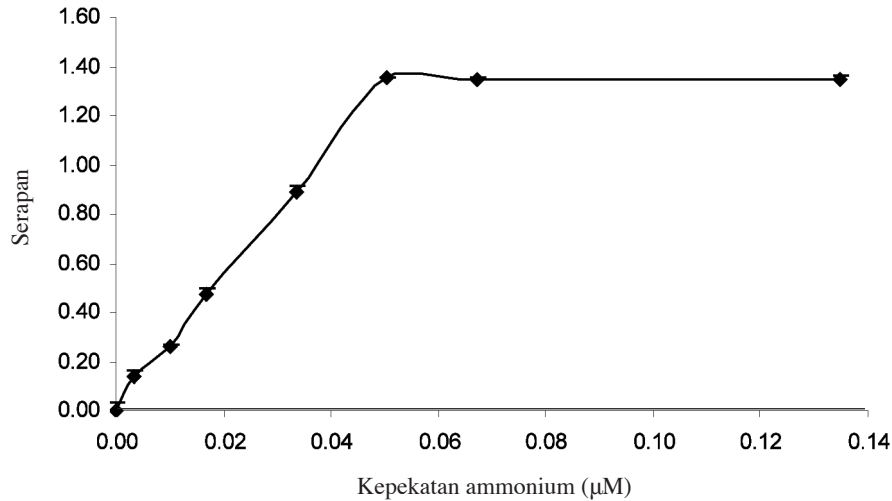
400 μ M. Kajian ini dilakukan pada keadaan optimum dan kepekatan GLDH, Dph, NADH, MTT, asid α -ketoglutarik masing-masingnya ditetapkan pada 13.2 unit/mL, 1.17 unit/mL, 0.15 mM, 0.2 mM, 0.2 mM. Dalam kajian ini nilai serapan direkodkan pada panjang gelombang 563 nm. Rajah 8 menunjukkan nilai perbezaan serapan tindak balas didapati semakin meningkat apabila kepekatan ammonium ditingkatkan. Nilai perbezaan serapan tindak balas didapati malar apabila ammonium ditingkatkan melebihi 50 μ M. Rajah 9 pula menunjukkan graf kalibrasi nilai perbezaan serapan melawan kepekatan ammonium. Didapati julat linear kepekatan ammonium adalah dalam julat di antara 3 - 50 μ M dengan had pengesanan 1 μ M. Nilai had pengesanan dikira dengan menggunakan kaedah yang dilaporkan oleh Day dan Underwood (1987). Nilai kecerunan yang diperolehi adalah 26.271 dengan nilai pemalar korelasi ialah 0.9982.



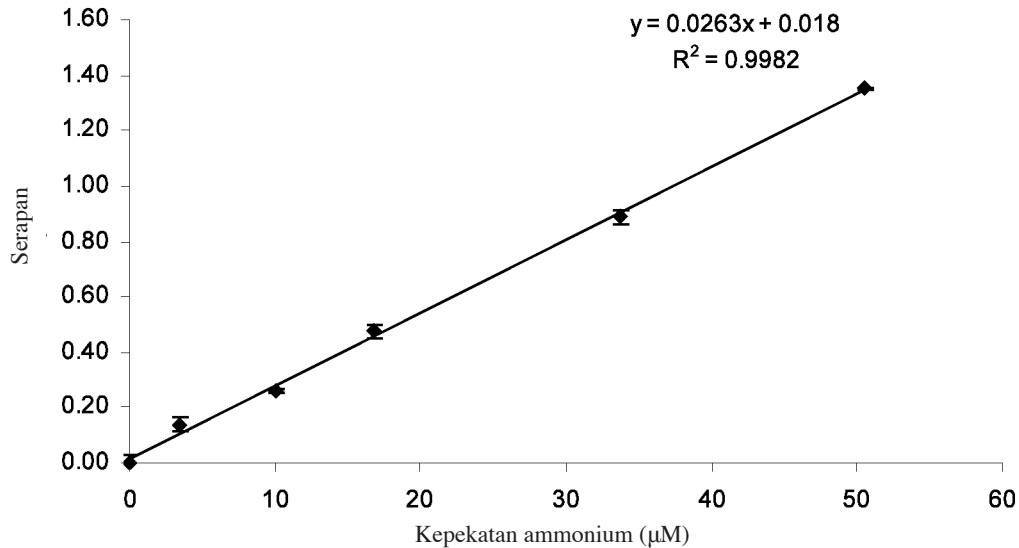
RAJAH 6. Hubungan di antara perbezaan serapan melawan kepekatan NADH dalam julat 0.05 – 0.25 mM (n = 3)



RAJAH 7. Kesan kepekatan asid α -ketoglutarik terhadap tindak balas pengesanan ammonium pada panjang gelombang 563 nm (n = 3)



RAJAH 8. Rangsangan tindak balas enzim bebas terhadap kepekatan ammonium yang berbeza (n = 3)



RAJAH 9. Graf kalibrasi nilai perbezaan serapan melawan kepekatan ammonium dalam julat rangsangan linear 3 – 50 µM

KESIMPULAN

Hasil kajian menunjukkan bioanalisis pengesanan ammonium telah berjaya dilakukan dengan menggunakan sistem dua enzim GLDH-Dph digabungkan dengan reagen MTT sebagai penunjuk warna. Dalam kajian ini pengesanan ammonium dapat dilakukan dalam julat kepekatan di antara 3 – 50 µM dilakukan. Gabungan sistem dua enzim ini didapati berpotensi untuk dibangunkan sebagai biosensor untuk pengesanan ammonium.

PENGHARGAAN

Penyelidik merakamkan penghargaan kepada Kementerian Sains, Teknologi & Inovasi kerana sumbangan gran penyelidikan 02-03-02-SF 0002.

RUJUKAN

- Boer, W.D., Gunnewiek, P.A.K. & Laanbroek, H.J. 1995. Ammonium-oxidation at low pH by a chemolithotrophic bacterium belonging to the genus nitrosospira. *Soil Biology Biochemistry* 27(2): 127-132.
- Ciapetti, G., Cmni, E., Pratelli, L. & Pizzoferrato, A. 1992. In vitro evaluation of cell/biomaterial interaction by MTT assay. *Biomaterials* 14(5): 359-364.
- Day, R.A. & Underwood, A.L. 1987. *Quantitative Analysis*. Ed. Ke-4. New York: Prentice-Hall.
- Dubas, S.T. & Pimpan, V. 2008. Green synthesis of silver nanoparticles for ammonia sensing. *Talanta* 76: 29-33.
- Ghauch, A., Rima, J., Charef, A., Suptil, J., Fachinger, C. & Martin-Bouyer, M. 1999. Quantitative measurements of ammonium, hydrogenophosphate and Cu(II) by diffuse reflectance spectrometry. *Talanta* 48: 385-392.

- Kwan, R.C.H., Hon, P.Y.T. & Renneberg, R. 2005. Amperometric determination of ammonium with bienzyme/poly(carbamoyl) sulfonate hydrogel-based biosensor. *Sensors and Actuators B* 107: 616-622.
- Lau, K.T., Edwards, S. & Diamond, D. 2004. Solid state ammonia sensor based on Berthelot's reaction. *Sensors and Actuators B* 98: 12-17.
- Martinez, Y.M., Hernandez, R.H. & Falco, P.C. 2005. Improved detection limit for ammonium/ammonia achieved by Berthelot's reaction by use of solid-phase extraction coupled to diffuse reflectance spectroscopy. *Analytica Chimica Acta* 534: 327-334.
- Nur Ellina, A., Jaafar, A., Musa, A., Lee Y.H., Hamidah, S. & Nadarajah, K. 2009. Biosensor based on glutamate dehydrogenase immobilized in chitosan for the determination of ammonium in water samples, *Analytical Biochemistry* 388: 28-32.
- Odman, P., Wellborn, W.B. & Bommarius, A.S. 2004. An enzymatic process to a-ketoglutarate from L-glutamate: The coupled system L-glutamate dehydrogenase/NADH oxidase, *Tetrahedron Assymetry* 15: 2933-2937.
- Thornton, A., Pearce, P. & Parsons, S.A. 2007. Ammonium removal from solution using ion exchange on to MesoLite, an equilibrium study. *Journal of Hazardous Materials* 147: 883-889.
- Timmer, B., Olthuis, W. & Berg, A.V.D. 2005. Ammonia sensors and their applications-a review. *Sensor and Actuators B* 107: 666-667.
- Watanabe, E., Tamada, Y. & Hamada-Sato, N. 2005. Development of quality evaluation sensor for fish freshness control based on KI value. *Biosensors and Bioelectronics* 21: 534-538.
- Yamaguchi, F., Etoh, T. Takahashi, M. Misaki, H. Sakuraba, H. & Ohshima, T. 2005. A new enzymatic cycling method for ammonia assay using NAD synthetase. *Clinica Chim. Acta* 352: 165-173.
- Zougar, S., Morakchi, K. Zazoua, K. Saad, S. Kherrat, R. & Renault, N.J. 2008. Characterization of ammonium ion-sensitive membranes in solution with electrochemical impedance spectroscopy. *Materials Science and Engineering C* 28: 1020-1023.

Nur Ellina Azmi, Jaafar Abdullah*, Hamidah Sidek & Samsulida Abd Rahman
 Pusat Penyelidikan Bioteknologi Perindustrian
 SIRIM Berhad, No.1, Persiaran Dato' Menteri
 Seksyen 2, P.O. Box 7035
 40911 Shah Alam, Selangor D.E.
 Malaysia

Musa Ahmad & Lee Yook Heng
 Pusat Pengajian Sains Kimia dan Teknologi Makanan
 Fakulti Sains dan Teknologi
 Universiti Kebangsaan Malaysia
 43600 Bangi, Selangor D.E.
 Malaysia

*Pengarang untuk surat-menyurat; email: jaafar@sirim.my

Diserahkan: 2 September 2010

Diterima: 2 Februari 2011