

## **Teknik pengesanan pantas residu fungisid ditiokarbamat dalam sayur-sayuran menggunakan biosensor enzim**

(Rapid detection technique for dithiocarbamate fungicide residues in vegetables using enzyme-based biosensor)

Nurul Hidayah Ahmad Puat, Siti Noraini Bunawan, Azima Azmi, Khairatul Azmah Mohamed, Mohammad Shahid Shahrin, Erna Mutiara Masdek, Hidayatul Wahidah Sobri dan Nur Azura Mohd Said

### **Pengenalan**

Penggunaan racun perosak bagi mengawal agen perosak dan penyakit tanaman merupakan satu kaedah yang popular dalam kalangan petani di Malaysia selain daripada teknik kawalan mekanikal, kawalan biologi dan kawalan secara amalan kultur. Kebanyakan racun perosak adalah berbahaya kepada kesihatan manusia, haiwan dan tumbuh-tumbuhan. Pemilihan racun perosak bergantung kepada beberapa faktor seperti kos, keberkesanan, kesan terhadap tanah, tanaman atau ternakan serta tahap pengendaliannya. Bagi memastikan kesesuaian racun perosak serta mengurangkan risiko kerosakan terhadap tanaman dan juga manusia, Kod Etika Antarabangsa bagi Pengedaran dan Penggunaan Racun Perosak telah diguna pakai. Menjurus kepada “pengurusan yang kukuh ke atas racun perosak”, kod ini memberi tumpuan terhadap pengurangan risiko, perlindungan kesihatan manusia dan alam sekitar serta sokongan bagi pembangunan pertanian yang mampan. Kod etika ini mementingkan keberkesanan racun perosak dan penggunaan strategi kawalan perosak bersepadu atau *integrated pest management* (IPM).

Petani kini didapati cenderung mengamalkan teknik racun campuran atau *cocktail* racun sebagai kaedah untuk meningkatkan keberkesanan penggunaan racun perosak. Selain menjimatkan masa dan kos menyembur, kaedah ini dikatakan dapat menghapuskan pelbagai jenis serangga perosak secara serentak walaupun belum terbukti kebenarannya. Penggunaan racun perosak yang semakin berleluasa dalam kalangan para petani di Cameron Highlands juga semakin membimbangkan dan perlu dipantau dengan ketat agar kuantiti penggunaannya mematuhi piawaian. Penggunaan racun perosak yang tidak terkawal boleh meningkatkan risiko gangguan kesihatan bagi jangka masa panjang dalam kalangan pekerja di kawasan perladangan. Antara kesan buruk termasuklah kerosakan organ dalaman seperti hati, buah pinggang, paru-paru, perubahan hormon serta gangguan sistem saraf.

Agensi pemantauan dan pihak berkuasa memainkan peranan yang penting dalam memastikan dos-dos racun perosak yang digunakan oleh para petani mematuhi had maksimum residu

sisa racun [*maximum residue limit* (MRL)] yang telah ditetapkan. Lazimnya, sisa racun perosak ditentukan dengan kaedah analisis kimia menggunakan instrumen seperti spektrofotometer UV-Vis, spektrometri pelepasan plasma dengan gandingan induktif, spektrometri penyerapan atom, kromatografi gas, kromatografi cecair atau kromatografi cecair berprestasi tinggi digabungkan dengan pengesanan terpilih. Sisa racun perosak juga boleh ditentukan dengan menggunakan spektroskopi inframerah transformasi fourier (FTIR). Walau bagaimanapun, kesemua kaedah analisis kimia ini memakan masa yang lama dan melibatkan kos yang tinggi. Selain itu, teknik ini juga melibatkan penggunaan pelbagai reagen organik berbahaya dan memerlukan kemahiran juruteknik yang terlatih untuk pengendalian peralatan/instrumen.

Dalam hal ini, satu kaedah pengesanan pantas yang mudah, murah, sensitif dan boleh dipercayai serta dapat digunakan secara langsung di lapangan bagi tujuan pemantauan adalah amat diperlukan. Justeru, satu teknologi biosensor berasaskan enzim telah dibangunkan dengan pendekatan yang praktikal dan cepat untuk pengesanan pantas residu fungisid ditiokarbamat dalam sayur-sayuran terutamanya dalam sayur salad dan tomato. Prinsip umum di sebalik teknologi ini adalah pengukuran arus secara elektrokimia yang terhasil daripada tindak balas perencatan enzim pada permukaan transduser (strip elektrod) dengan kepekatan analit sasaran (i.e. racun fungisid ditiokarbamat).

### **Teknologi biosensor untuk pengesanan racun perosak**

Teknologi biosensor merupakan satu teknologi pintar yang sesuai digunakan dalam industri perladangan terutama sekali dalam pemantauan keselamatan pengeluaran sayur-sayuran. Teknologi ini sangat diperlukan untuk membantu memantau dan mengawal kadar penggunaan analit-analit racun perosak, racun serangga, racun kulat termasuk racun ditiokarbamat dalam penanaman sayur-sayuran. Pengesanan residu racun kulat atau fungisid dengan teknologi biosensor berasaskan enzim yang dibangunkan ini adalah mudah dan pantas dengan penggunaan reagen yang minimum berbanding dengan alat konvensional yang lain. Dengan kelengkapan peranti biosensor mudah alih, pengesanan residu fungisid ditiokarbamat dalam sampel sayur-sayuran dapat dijalankan terus di lapangan (*real time on-site monitoring*) tanpa perlu membawa sampel ke makmal untuk diuji.

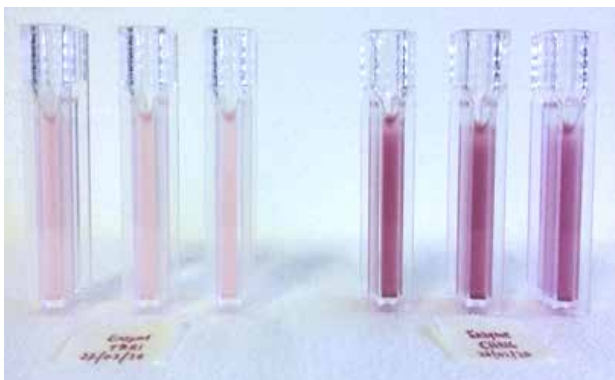
Terdapat empat jenis fungisid ditiokarbamat yang dikaji dalam pembangunan biosensor enzim ini iaitu zineb, maneb, mancozeb dan thiram. Enzim dehidrogenase dipegunkan ke atas permukaan strip elektrod skrin bercetak [*screen printed electrode* (SPE)] yang telah diubah suai dengan jaringan polimer polipirol, grafena dan koloid emas bersaiz nano. Permukaan elektrod yang terubah suai ini membentuk satu lapisan nipis sebagai jaringan dan medium untuk penjerapan enzim bagi menambah kecekapan dan sensitiviti dengan analit sasaran. Pengukuran arus

elektrokimia dijalankan menggunakan teknik *chronoamperometry* di mana kehadiran fungisid ditiokarbamat (zineb, maneb, mancozeb dan thiram) dalam sampel sayur-sayuran pada kepekatan berbeza akan merencatkan fungsi enzim dehidrogenase yang telah dipegunkan pada permukaan strip SPE.

### **Pengesanan residu fungisid ditiokarbamat dalam sayur-sayuran**

#### ***Penyediaan enzim untuk kegunaan biosensor***

Enzim yang telah berjaya dipencilkan daripada kultur condong (*slant culture*) dicirikan melalui beberapa asai asas seperti penentuan aktiviti enzim dan penentuan kandungan protein dalam enzim. Berdasarkan uji kaji yang dijalankan, enzim ini mempunyai aktiviti enzim dalam julat  $1.233E^{-2} \mu\text{molmL}^{-1}\text{min}^{-1}$  hingga  $2.376E^{-1} \mu\text{molmL}^{-1}\text{min}^{-1}$  dan kandungan protein dalam julat 3.604 – 3.895 mg/mL. Enzim ini seterusnya akan dipegunkan di atas permukaan strip SPE yang telah diubah suai dan enzim ini bertindak sebagai elemen biologi dalam pembangunan kit biosensor bagi penentuan pantas racun ditiokarbamat dalam sayur-sayuran.

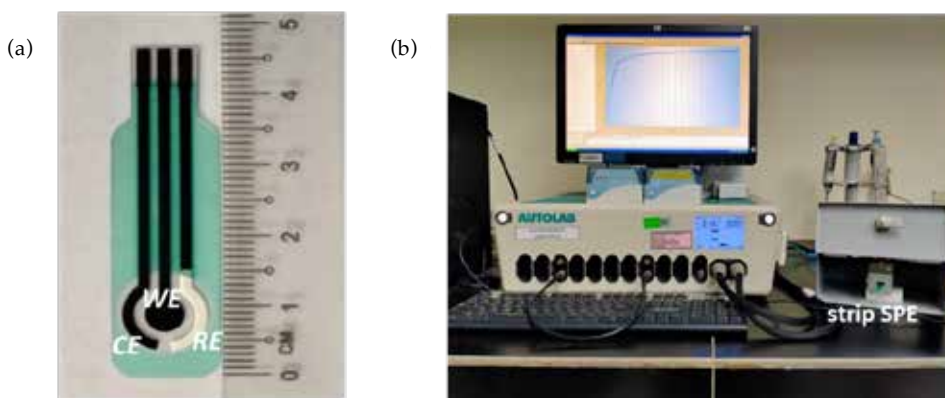


Gambar 1. Perbezaan antara enzim dehidrogenase komersial (kiri) dengan enzim dehidrogenase yang dihasilkan di MARDI (kanan) setelah dicampurkan dengan triphenyl tetrazolium chloride (TTC) dan racun ditiokarbamat

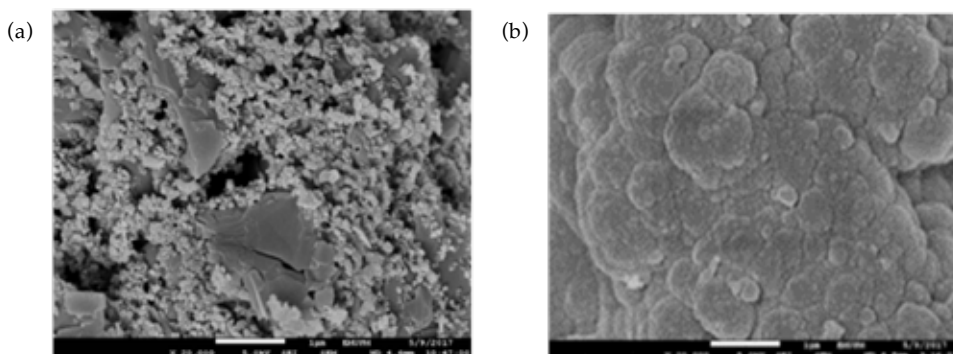
#### ***Penyediaan strip SPE dan pemegunan enzim untuk pengesanan pantas racun fungisid ditiokarbamat***

Strip biosensor SPE yang digunakan untuk pengukuran tindak balas merupakan strip pakai buang dan mengandungi tiga komponen elektrod utama iaitu *working electrode* (WE), *reference electrode* (RE) dan *counter electrode* (CE) [Gambar 2(a)]. Proses pemegunan enzim dehidrogenase ke atas permukaan WE dilakukan secara pemendapan elektrokimia secara *chronoamperometry* selama 900 saat bersama-sama dengan larutan polipirol, grafena dan koloid emas. Tindak balas antara enzim dan substrat dengan kehadiran atau tanpa kehadiran analit perencat (fungisid ditiokarbamat) berlaku pada permukaan elektrod berfungsi (WE) dan perubahan arus yang terhasil seterusnya dicerap dan direkodkan.

Kiraan terhadap peratusan luas permukaan aktif strip SPE yang telah diubah suai dengan jaringan polimer, grafena dan koloid emas didapati meningkat kepada 41.60% berbanding dengan 15.70% bagi elektrod yang tidak diubah suai. Nilai kepadatan arus pula meningkat daripada  $0.029 - 0.077 \text{ mAcm}^{-2}$  setelah permukaan elektrod diubah suai. Peningkatan nilai-nilai ini menunjukkan prestasi dan kebolehlugan strip sensor yang lebih baik pada elektrod yang telah diubah suai. *Gambar 3* menunjukkan imej mikroskop elektron pengimbas pelepasan medan (FESEM) pada pembesaran 10,000x untuk kajian pencirian permukaan sebelum dan selepas diubah suai dengan jaringan polimer polipirol, grafena, koloid emas dengan enzim.



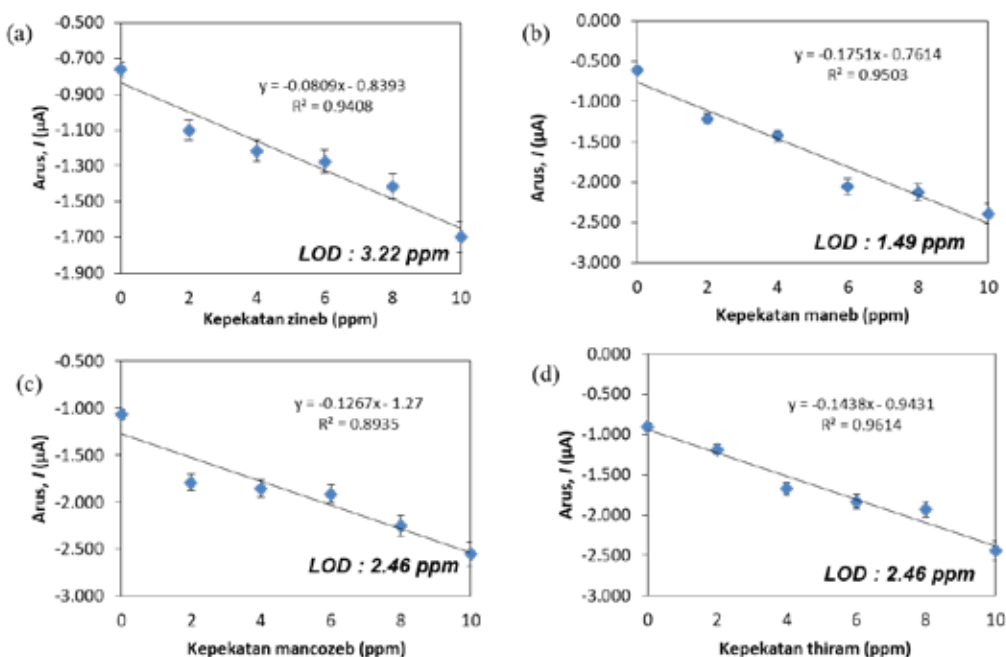
*Gambar 2. (a) Strip elektrod bercetak skrin (SPE) yang digunakan dalam sistem biosensor enzim (b) Paparan pengukuran arus elektrokimia pada skrin komputer yang terhasil daripada tindak balas pada permukaan strip SPE*



*Gambar 3. Perbezaan permukaan strip SPE (a) sebelum diubah suai dengan (b) permukaan strip SPE telah diubah suai dengan campuran larutan polipirol, grafena dan koloid emas bersaiz nano, bersama enzim yang dipegunkan. Pembesaran imej 10,000x*

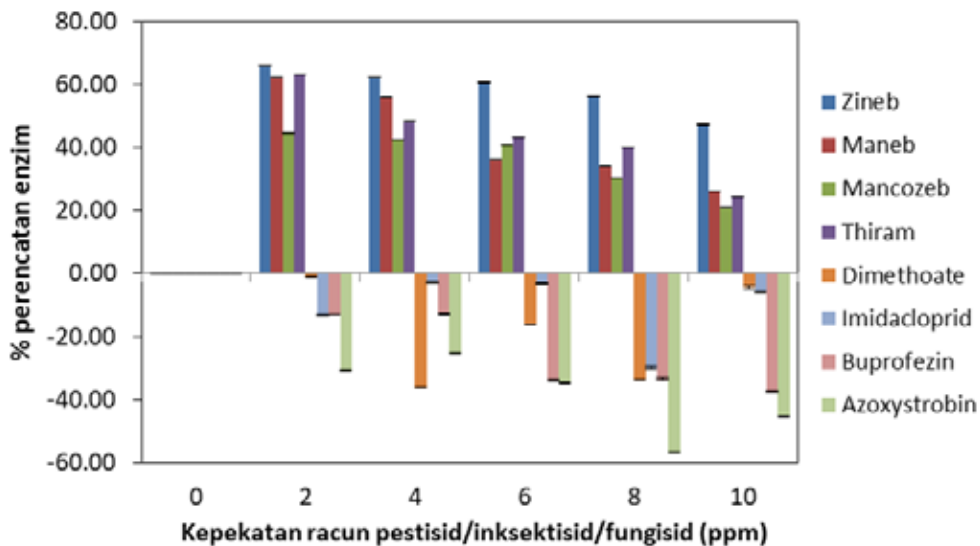
### Pembangunan graf lengkung piawai bagi fungisid ditiokarbamat

Lengkuk piawai residu fungisid ditiokarbamat (zineb, maneb, mancozeb dan thiram) dibangunkan dengan menggunakan larutan piawai yang disediakan secara pencairan bersiri pada pelbagai kepekatan daripada 0 – 10 ppm. Stok larutan piawai fungisid ditiokarbamat (100 ppm) disediakan menggunakan 20% metanol sebagai pelarut. Pengukuran elektrokimia dilakukan dengan teknik *chronoamperometry* pada potensi voltan tetap (V) selama 200 saat menggunakan strip SPE terubah suai dengan enzim dehidrogenase terpegun. Graf lengkung linear perubahan arus terhadap kepekatan larutan piawai racun zineb, maneb, mancozeb dan thiram diplot pada pelbagai kepekatan. Sensitiviti strip SPE untuk pengesanan pantas racun fungisid ditiokarbamat diperolehi daripada cerun lengkung piawai untuk setiap jenis racun. Perencatan enzim adalah meningkat dan berkadar terus dengan pertambahan kepekatan fungisid ditiokarbamat. *Rajah 1(a – d)* menunjukkan graf lengkung piawai bagi setiap fungisid ditiokarbamat zineb, maneb, mancozeb dan thiram masing-masing bersama nilai had pengesanan [*limit of detection* (LOD)].



Rajah 1. Graf lengkung piawai bagi fungisid ditiokarbamat (a) zineb, (b) maneb, (c) mancozeb; dan (d) thiram dengan julat kepekatan daripada 0 – 10 ppm dalam larutan piawai berserta LOD masing-masing

Kajian tindak balas silang biosensor enzim dengan racun jenis lain turut dijalankan bagi mengkaji sensitiviti dan kespesifikan enzim dehidrogenase terhadap fungisid ditiokarbamat (zineb, maneb, mancozeb dan thiram) dalam sampel sayur-sayuran. Eksperimen dilakukan dengan kehadiran racun lain seperti dimethoate, imidacloprid, buprofezin dan azoxystrobin pada kepekatan 0 – 10 ppm. Setiap pengukuran dibuat sebanyak tiga replikat ( $n = 3$ ) untuk setiap kepekatan racun perosak. *Rajah 2* menunjukkan enzim dehidrogenase yang digunakan dalam pembangunan biosensor enzim bagi pengesanan racun ditiokarbamat ini adalah spesifik terhadap racun zineb, maneb, mancozeb dan thiram dengan peratusan kadar perencatan enzim adalah dalam julat 25.0 – 70.0%.



*Rajah 2. Peratusan kadar perencatan enzim oleh fungisid ditiokarbamat (zineb, maneb, mancozeb dan thiram) dan racun perosak lain seperti dimethoate, imidacloprid, buprofezin dan azoxystrobin pada kepekatan yang berbeza*

### ***Penyediaan sampel dan pengesanan fungisid ditiokarbamat menggunakan kaedah biosensor enzim***

Aplikasi biosensor untuk pengesanan pantas fungisid ditiokarbamat melibatkan dua jenis sayur-sayuran iaitu salad (mewakili sayur-sayuran berdaun) dan tomato (mewakili sayur-sayuran berbuah). Bagi penyediaan sampel, kaedah pengekstrakan sayur-sayuran yang mudah tanpa penggunaan larutan organik digunakan. Peranti mudah alih biosensor dengan integrasi *internet-of things* (IoT) yang dibangunkan bersama syarikat Biogenes Technologies digunakan bagi pengesanan pantas sisa fungisid ditiokarbamat dalam sayur-sayuran di lapangan. Proses penentuan sisa fungisid ditiokarbamat dalam sampel sayur-sayuran menggunakan teknik pengesanan pantas biosensor adalah seperti dalam *Gambar 4*.



Gambar 4. Proses penyediaan sampel sayur-sayuran bagi pengesanan pantas racun ditiokarbamat menggunakan peranti mudah alih biosensor dengan IoT di lapangan

### Perbandingan kaedah biosensor enzim dengan teknik pengesanan racun ditiokarbamat lain

Penentuan sisa fungisid ditiokarbamat dalam sampel sayur-sayuran (salad dan tomato) menggunakan teknik pengesanan pantas biosensor memberikan banyak kelebihan berbanding dengan kaedah konvensional instrumentasi dan teknik *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA). Penentuan sisa fungisid ditiokarbamat menggunakan teknik biosensor (peranti mudah alih biosensor dengan IoT) adalah mudah, pantas, tidak menggunakan reagen yang berbahaya, boleh dijalankan di lapangan (ladang, pasar raya, rumah dan tempat-tempat lain) dan yang paling penting adalah kos-efektif berbanding dengan teknik konvensional. Perbandingan terperinci tentang kelebihan kaedah biosensor dengan kaedah konvensional (instrumentasi) dan ELISA bagi pengesanan dan penentuan sisa fungisid ditiokarbamat adalah seperti dalam *Jadual 1*.

Jadual 1. Perbezaan pengesanan dan penentuan fungisid ditiokarbamat menggunakan kaedah biosensor, kaedah konvensional (instrumentasi) dan asai ELISA

Faktor	Biosensor	Kaedah konvensional	ELISA
Tujuan analisis	Saringan	Pengesahan	Pengesahan
Tempoh penyediaan sampel	45 minit	1 – 3 hari	3 – 4 jam
Tempoh pengukuran bacaan	3 – 5 minit	30 – 45 minit	10 – 30 minit
Kepakaran menggunakan peralatan	Boleh dilakukan oleh orang awam	Perlu ahli terlatih dalam bidang analisis kimia	Perlu ahli terlatih dalam bidang analisis kimia
Lokasi analisis	Makmal dan di lapangan	Makmal	Makmal
Mudah alih	Ya. Peranti biosensor kecil dan ringan	Tidak	Tidak
Anggaran kos analisis per sampel (tiga kali ulangan)	RM25 – RM30	RM250 – RM300	RM40 – RM80

### Kesimpulan

Penentuan racun kulat atau fungisid ditiokarbamat dalam sampel sayur-sayuran adalah penting bagi memastikan para petani dan peladang mematuhi nilai had maksimum residu (MRL) racun perosak yang digunakan ke atas sayur-sayuran dan seterusnya selamat untuk dimakan. Teknik biosensor untuk penentuan pantas residu fungisid ditiokarbamat dalam sayur-sayuran telah berjaya dibangunkan menggunakan enzim dehidrogenase yang dipegunkan pada permukaan strip SPE yang diubah suai dengan campuran larutan polifirol, grafena dan koloid emas bersaiz nano. Teknik biosensor ini mampu mengesan residu ditiokarbamat zineb, maneb, mancozeb dan thiram dalam masa 15 minit termasuk masa inkubasi 10 minit untuk reaksi perencatan enzim dan 2 minit untuk reaksi enzim-substrat. Analisis biosensor ini boleh dilakukan di lapangan dengan menggunakan peranti biosensor mudah alih yang kecil, ringan dan dilengkapi dengan teknologi IoT. Teknik ini adalah mesra pengguna, praktikal dan sesuai digunakan oleh petani, agensi pemantauan dan pihak berkuasa untuk memantau dan mengawal penggunaan racun perosak. Teknik biosensor ini mempunyai potensi yang besar sebagai alat saringan dalam pemantauan residu ditiokarbamat secara berkala untuk pengurusan kualiti dalam industri makanan dan seterusnya mengurangkan kadar penolakan eksport oleh negara luar.

### Penghargaan

Penulis ingin menyampaikan ucapan terima kasih atas sokongan kewangan yang diberikan oleh MARDI bawah geran Projek Pembangunan RMK-11 (P-RB403) dan kesemua ahli pasukan dalam subprojek 'Pembangunan Sistem Pengesanan Pantas



Untuk Penentuan Kontaminasi Dalam Sayur-Sayuran'. Ingatan tulus ikhlas dan penghargaan kepada arwah Puan Salmah Abdul Aziz yang banyak memberikan sumbangan dari segi ilmu dan kepakaran sepanjang perkhidmatan beliau sebagai Ketua Aktiviti.

### **Bibliografi**

- Goranka, C. dan Wolfgang, S. (2009). Residue analysis of dithiocarbamate fungicides. *Trends in Analytical Chemistry* 28 (1)
- Gupta, P.K. (2011). Chapter 39 in Reproductive and Development Toxicology – *Herbicides and fungicides*, m.s. 503 – 521
- Knio, K.M., Saad, A. dan Dagher, S. (2000). The fate and persistence of zineb, maneb, and ethylenethiourea on fresh and processed tomatoes. *Food Additives and Contaminants* 17(5): 393 – 398
- Mulchandani, A. (1998). Principles of enzyme biosensors. Dalam: *Enzyme and Microbial Biosensors* m.s. 3 – 14. Humana Press
- Mun'delanji, C.V., Keiichiro, Y. dan Eiichi, T. (2016). Printable electrochemical biosensors: a focus on screen-printed electrodes and their application: *Journal of Sensor* 16(10): 1761
- Norida, M., Halimatunsadiah, A.B., Omar, D. dan Kamarulzaman, N.H. (2016). Application of pesticide in pest management: The case of lowland vegetable growers. *International Food Research Journal* 23(1): 85 – 94
- Nurul Hidayah, A.P. (2014). Development of biosensor probe for detection of Malachite Green and Leuco-Malachite Green for application in fishery industry. Malaysia: University of Putra Malaysia. *Msc Thesis*
- Özlem, K. dan Nuri, N. (2013). Determination of zineb in tap water and tomato samples by adsorptive catalytic stripping voltammetry. *Turkish Journal of Chemistry* 37: 712 – 720
- Rubino, F.M., Mrema, E.J. dan Colosio, C. (2014). Pesticide residues: dithiocarbamates. Reference module in food science. *Encyclopedia of Food Safety* 3: 5 – 10
- Săndulescu, R., Tertîș, M., Cristea, C. dan Bodoki, E. (2015). New materials for the construction of electrochemical biosensors. *Nanotechnology and nanomaterials book (chapter – biosensors-micro and nanoscale applications)* (2013). Micro-determination of dithiocarbamates in pesticide formulations using voltammetry. *Microchemical Journal* 110: 334 – 339
- Shanker, G.A., Smita, A. dan Pahup, S. (2005). Quantification of ziram and zineb residues in fog-water samples. *Talanta* 65: 104 – 110
- Sharma, V.K., Aulakh, J.S. dan Malik, A.K. (2005). Fourth derivative spectrophotometric determination of fungicide thiram (tetramethyl dithiocarbamate) using sodium molybdate and its application. *Talanta* 65: 375 – 379
- Wang, J. (2000). *Analytical Electrochemistry, Second Edition*. Wiley-Vch, A John Wiley and Sons Publication, New York

### **Ringkasan**

Penggunaan fungisid yang berleluasa tanpa kawalan dan tidak mematuhi garis panduan dan piawaian dalam kalangan petani amat membimbangkan. Implikasinya, kerajaan telah menanggung kerugian yang besar akibat penolakan konsainmen sayur-sayuran yang dieksport ke luar negara yang dikesan mengandungi kadar pestisid yang melebihi nilai had maksimum residu (MRL) yang ditetapkan. Pengambilan sayur-sayuran yang tercemar dengan racun fungisid dalam jangka masa yang panjang juga boleh mengganggu kesihatan manusia. Justeru, satu kaedah pengesanan fungisid yang mudah, pantas dan boleh digunakan di lapangan adalah amat diperlukan. Dalam hal ini, satu teknologi biosensor berasaskan enzim telah dibangunkan menggunakan enzim dehidrogenase tempatan. Enzim

ini dipegunkan pada permukaan elektrod bercetak skrin (SPE) yang terubah suai dengan jaringan polimer konduktif polipirol, grafena dan koloid emas bersaiz nano. Strip SPE yang telah diubah suai menunjukkan peningkatan luas permukaan aktif dan nilai kepadatan arus yang lebih baik berbanding dengan SPE yang tidak diubah suai. Teknik biosensor yang dibangunkan berupaya mengesan empat jenis racun ditiokarbamat (zineb, maneb, mancozeb dan thiram) dalam tempoh 15 minit dengan proses penyediaan sampel yang mudah berbanding dengan kaedah konvensional yang lain. Dengan peranti mudah alih biosensor berintegrasi *internet-of-things* (IoT), pengesanan biosensor dapat dijalankan di lapangan justeru sesuai digunakan oleh agensi penguat kuasa mahupun petani bagi tujuan pemantauan dalam memastikan produk sayur-sayuran tempatan adalah selamat untuk dimakan.

### **Summary**

Non-compliance and the wide usage of fungicides without control within the stated guidelines among the farmers are becoming great concern. Rejection of exported vegetables consignments containing pesticide residues exceeding the maximum residue limit value has resulted in great loss to the government. Over a long time period, consumption of vegetables contaminated with fungicides is detrimental to human health. Under this circumstance, a simple, rapid and on-site detection method for fungicides is very handy. We reported here the development of an enzyme-based biosensor which utilized local dehydrogenase enzyme. The enzyme was immobilized on modified screen-printed electrode (SPE) surface with conducting polypyrrole polymer, graphene and nano-sized gold colloid network. The modified SPE showed increment in both active surface area and current density compared to the unmodified SPE. The developed biosensor technique is able to detect four types of dithiocarbamate (i.e. zineb, maneb, mancozeb and thiram) within 15 minutes employing a simple sample preparation process as opposed to other conventional methods. Equipped with IoT-biosensor mobile device, the biosensor detection can be carried out in the field and therefore suitable to be used by enforcement agencies or even farmers for monitoring purposes in ensuring local vegetable products are safe to be consumed.

### **Pengarang**

Nurul Hidayah Ahmad Puat

Pusat Penyelidikan Bioteknologi dan Nanoteknologi

Ibu Pejabat MARDI, Persiaran MARDI-UPM, 43400 Serdang, Selangor

E-mel: nurulhidayah@mardi.gov.my

Siti Noraini Bunawan, Azima Azmi, Erna Mutiara Masdek, Hidayatul Wahidah

Sobri dan Nur Azura Mohd Said (Dr.)

Pusat Penyelidikan Bioteknologi dan Nanoteknologi

Ibu Pejabat MARDI, Persiaran MARDI-UPM, 43400 Serdang, Selangor

Khairatul Azmah Mohamed dan Mohammad Shahid Shahrin

Pusat Penyelidikan Sains Tanah, Air dan Baja

Ibu Pejabat MARDI, Persiaran MARDI-UPM, 43400 Serdang, Selangor