

Biosensor Berasaskan Sel *E. coli* Terubahsuai Protein Pendarfluor Hijau (GFP *E. coli*) Terpegun Mikrosfera Alginat untuk Pengukuran Ketoksikan Air (Biosensor Based on Green Fluorescent Protein-Modified *E. coli* (GFP *E. coli*) Cells-Immobilised Alginate Microspheres for Water Toxicity Measurements)

DEDI FUTRA^{1,2}, LING LING TAN³, SALMIJAH SURIH¹ & LEE YOOK HENG^{1,*}

¹Jabatan Sains Kimia, Fakulti Sains dan Teknologi, Universiti Kebangsaan Malaysia, 43600 UKM Bangi, Selangor, Malaysia

²Department of Chemistry Education, Faculty of Education, Universitas Riau, Kampus Binawidya KM 12.5 Pekanbaru, 28131, Riau, Indonesia

³Pusat Kajian Bencana Asia Tenggara (SEADPRI), Institut Alam Sekitar dan Pembangunan (LESTARI), Universiti Kebangsaan Malaysia, 43600 UKM Bangi, Selangor, Malaysia

Diserahkan: 25 Oktober 2024/Diterima: 29 Disember 2024/32

ABSTRAK

Biosensor ketoksikan optik telah direka bentuk berasaskan mikroorganisma sel keseluruhan terpegun iaitu strain DH5α *Escherichia coli* terubah suai protein pendarfluor hijau (GFP *E. coli*) dalam mikrosfera alginat melalui mikroenkapsulasi untuk pengesanan bahan toksik, seperti logam berat [Cu(II), Cd(II), Pb(II), Zn(II), Cr(VI), Co(II), Ni(II), Ag(I) dan Fe(III)], racun rumpai [2,4-asid diklorofenoksiasetik (2,4-D)] dan racun serangga (klorpirifos). Biosensor bakteria yang teguh dan mudah alih telah dicirikan dengan kaedah spektrofotometrik gentian optik. Kehadiran bahan pencemar alam sekitar telah mengubah ciri aruhan pendarfluor GFP *E. coli* dan mengakibatkan perubahan fotokimia. Rangsangan biosensor diukur pada panjang gelombang pengujaan dan pemancaran pendarfluor optimum masing-masing pada 400±2 nm dan 485±2 nm. Had pengesanan (LOD) biosensor untuk logam berat, racun rumpai dan racun serangga diperoleh masing-masing pada 0.06-2900.00 µg/L, 0.07 µg/L dan 36.50 µg/L. Ujian kebolehulangan biosensor menunjukkan sisihan piawai relatif (RSD) purata pada <5.0% dan rangsangan biosensor adalah stabil sehingga enam minggu. Biosensor memberikan rangsangan perencatan terhadap toksik tunggal dalam susunan Cu(II)>klorpirifos>Cd(II)>Pb(II)>Zn(II)>2,4-D>Cr(VI)>Co(II)>Ni(II)>Ag(I)>Fe(III). Biosensor mikrob yang dibangunkan menunjukkan rangsangan antagonis untuk campuran ketoksikan dan ia boleh mengukur kehadiran bahan toksik campuran ini pada tahap antagonis 86-100%. Biosensor gentian optik berasaskan mikrosfera alginat telah dicirikan untuk pengesanan tahap pencemaran toksik dalam sampel air persekitaran. Keputusan penentusahan yang diperoleh menggunakan mikrosfera alginat terubah suai GFP *E. coli* adalah setanding dengan keputusan yang diperoleh menggunakan kaedah spektroskopik seperti spektroskopi serapan atom (AAS) dan kromatografi gas-spektroskopi jisim (GC-MS).

Kata kunci: biosensor gentian optik; biosensor sel keseluruhan; GFP *E. coli*; logam berat; mikrosfera alginat

ABSTRACT

An optical toxicity biosensor has been designed based on immobilised whole-cell microorganisms i.e., green fluorescent protein-modified DH5α strain of *Escherichia coli* (GFP *E. coli*) in the alginate microspheres via microencapsulation for detection of toxicants, such as heavy metals [Cu(II), Cd(II), Pb(II), Zn(II), Cr(VI), Co(II), Ni(II), Ag(I), and Fe(III)], herbicide [2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D)], and insecticide (chlorpyrifos). The robust and mobile bacterial biosensor was characterised with the fiber optic spectrofluorimetric method. The presence of environmental pollutants altered the GFP *E. coli* fluorescence induction characteristic and resulted in photochemical changes. The biosensor response was measured at optimal fluorescence excitation and emission wavelengths at 400±2 nm and 485±2 nm, respectively. The limit of detections (LOD) of the biosensor for heavy metals, herbicide, and insecticide were found to be 0.06-2900 µg/L, 0.07 µg/L, and 36.5 µg/L, respectively. The reproducibility test of the biosensor showed an average relative standard deviation (RSD) of <5.0% and the biosensor response was stable for up to six weeks. The biosensor gave inhibition response toward single toxicant in the order of Cu(II)>chlorpyrifos>Cd(II)>Pb(II)>Zn(II)>2,4-D>Cr(VI)>Co(II)>Ni(II)>Ag(I)>Fe(III). The developed microbial biosensor showed antagonistic results for toxicity mixture, whereby it can quantify the presence of these mixed toxicants at 86–100% antagonistic level. The alginate microspheres-based optical fiber biosensor has been characterised for the detection of toxicant contamination levels in environmental water samples.

The validation results obtained using GFP *E. coli*-modified alginate microspheres were in good agreement with those obtained using spectroanalytical methods e.g., atomic absorbance spectroscopy (AAS) and gas chromatography-mass spectroscopy (GC-MS).

Keywords: Alginate microspheres; GFP *E. coli*; heavy metal; optical fiber biosensor; whole cell biosensor

PENGENALAN

Biosensor mikrob berasaskan sel keseluruhan mikroorganisma yang menggunakan fungsi penderiaan mikrob semula jadi semakin menarik untuk pengesanan bahan toksik (contohnya, logam berat dan racun perosak) kerana kelebihannya seperti platform yang murah, mudah digunakan, bersaiz kecil, kaedah pengasingan mikrob yang ringkas, penghasilan bakteria tanpa had, had pengesanan rendah pada tahap ppb, boleh dijana semula, sensitiviti tinggi dan julat dinamik yang luas (Chen et al. 2023; Moraskie et al. 2021; Rathnayake, Megharaj & Naidu 2021). Sehingga kini, aplikasi biosensor berasaskan sel bakteria dalam penentuan kuantitatif logam berat pernah dilaporkan menggunakan GFP *E. coli* (Arias-Barreiro et al. 2010; Chakraborty et al. 2008; Martinez, Heil & Charles 2019), *E. coli* (pGL3-luc/Cad) (Nourmohammadi et al. 2020), *Acinetobacter baylyie Tox2* (luxCDABE) (Cui et al. 2018) dan *E. coli* (Lux AB) berdasarkan transduser spektrofotometri kuvet kuarsa (Arias-Barreiro et al. 2010) dan luminometri plat mikro (Chakraborty et al. 2008; Martinez, Heil & Charles 2019; Nourmohammadi et al. 2020; Wang et al. 2021). Walau bagaimanapun, terdapat kelemahan major kerana biosensor ketoksikan berasaskan mikroorganisma yang dibangunkan sebelum ini mengambil masa tindak balas yang panjang. Sementara itu, ujian ketoksikan mikrob yang menggunakan sel GFP *E. coli* bebas, yang mana bahan toksik lazimnya ditambah ke dalam medium kultur sel untuk tempoh pengeraman yang panjang (~16-24 jam), dengan itu melambatkan pengukuran isyarat pendarfluor (Chakraborty et al. 2008; Martinez, Heil & Charles 2019).

Biosensor mikrob untuk mengesan ketoksikan racun perosak telah dilaporkan menggunakan *E. coli* (His-Nus-OPH) (Jain et al. 2021), *E. coli* (pUC57-OPH-QS-DSF-F42L) (He et al. 2022) dan *E. coli* (XL1-biru-OPH) (Khatun et al. 2018). Walau bagaimanapun, kelemahan biosensor sel bakteria tersebut dalam pengesanan racun perosak adalah seperti kepekaan yang rendah, had pengesanan (LOD) yang tinggi pada tahap ppm dan julat pengesanan yang sempit. Manakala, biosensor sel keseluruhan untuk ketoksikan logam berat telah dicadangkan menggunakan *Vibrio* sp. (Mohseni et al. 2018), *Aliivibrio fischeri* (Futra et al. 2014), *Saccharomyces cerevisiae* (BY-ade2-P_{CUP}-ADE5,7) (Vopálenská, Váchová & Palková 2015) dan *E. coli* roGFP2 (Ooi, Lee & Mori 2015). Biosensor mikrob tersebut dalam penentuan ketoksikan logam berat telah berjaya direka bentuk daripada membran selulosa nitrat yang dilitupi dengan mikrosfera alginat (Futra et al. 2014),

matriks *k*-carrageenan (Ooi, Lee & Mori 2015) dan manik alginat (Vopálenská, Váchová & Palková 2015) telah berjaya digunakan untuk mengesan ketoksikan logam berat termasuk Cu(II) (Futra et al. 2014; Vopálenská, Váchová & Palková 2015); Zn(II) (Futra et al. 2014; Mohseni et al. 2018); Cd(II), Pb(II), Cr(IV), Co(II), Ni(II), Ag(I) dan Fe(III) (Futra et al. 2014); As(III) dan Se(IV) (Ooi, Lee & Mori 2015). Walau bagaimanapun, biosensor mikrob ketoksikan logam berat yang digunakan sebelum ini mempunyai beberapa batasan, seperti kepekaan dan kestabilan yang rendah (Mohseni et al. 2018; Zevallos-Aliaga et al. 2024) dan lineariti yang lemah dalam julat yang luas (Valenzuela-García et al. 2023; Vopálenská, Váchová & Palková 2015; Wu et al. 2021).

Dalam kajian ini, biosensor ketoksikan berdasarkan GFP *E. coli* terpegun dalam mikrosfera alginat berganding dengan transduser spektrofotometri gentian optik telah dibangunkan. Aplikasi mikrosfera alginat sebagai matriks pemegun bagi enkapsulasi sel bakteria belum pernah lagi diterokai dalam kajian penentuan ketoksikan logam berat. Mikrosfera alginat pernah dieksplotasi sebagai biomatriks untuk memegun mioglobin dalam penentuan hidrogen peroksida (Hu & Sun 2019) atau sebagai matriks pemegun enzim urease dalam penentuan kuantitatif kepekatan urea (Khattab et al. 2019) serta kolesterol oksidase untuk penilaian tahap kolesterol (Prasad et al. 2011). Enzim terpegun mikrosfera alginat telah menunjukkan peningkatan prestasi dalam had pengesanan dan julat tindak balas linear mikrobiosensor enzim tersebut. Mikrosfera alginat dipilih sebagai matriks pemegun GFP *E. coli* dalam kajian ini kerana sifat bioserasinya yang baik, kaedah pemegunan yang pantas dan mudah yang boleh dilakukan pada suhu bilik dan berkost rendah (Abasalizadeh et al. 2020; Cano-Vicent et al. 2023; Kumar et al. 2023; Raus, Nawawi & Nasaruddin 2021; Sahoo & Biswal 2021). Disebabkan sel bakteria GFP *E. coli* adalah diperangkap dalam mikrosfera alginat bioserasi, ia menggalakkan kestabilan tinggi biosensor mikrob yang disediakan. Selain itu, luas permukaan pemegunan yang besar dan saiz seragam mikrosfera alginat telah meningkatkan prestasi biosensor mikrob dari segi keboleholungan, masa ransangan, LOD dan julat rangsangan dinamik berbanding dengan biosensor mikrob berasaskan membran dua dimensi menggunakan transduser elektrokimia (Yu et al. 2020, 2017) dan ujian ketoksikan menggunakan sel bakteria bebas berdasarkan transduser spektrofotometri (Arias-Barreiro et al. 2010) dan luminometri (Chakraborty et al. 2008; Martinez, Heil & Charles 2019; Nourmohammadi et al. 2020; Wang et al. 2021).

BAHAN DAN KAEDAH

BAHAN KIMIA

Semua bahan kimia yang digunakan adalah bergred analitik. CdCl_2 , PbCl_2 , ZnCl_2 , CuCl_2 , $\text{K}_2\text{Cr}_4\text{O}_7$, KCl , NaCl , klorpirifos, 2,4-D dan penimbal Hepes diperoleh daripada Sigma Chemical, USA. $\text{Co}(\text{NO}_3)_2$, AgNO_3 , $\text{Ni}(\text{NO}_3)_3$, $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$ dan medium Luria-Bertani (tripton, ekstrak yis, NaCl) telah dibeli dari BDH, New Zealand. NaOH dan HCl masing-masingnya daripada Fluka dan Systerm. Semua alat radas kaca dibersihkan dengan rendaman dalam asid nitrik 15% untuk 24 jam bagi menyingkirkan unsur surih dan disterilkan melalui autoklaf pada suhu 121°C selama 20 minit.

KAEDAH PENGUBAHSUAIAN GFP *E. coli* SECARA GENETIK DAN PENGKULTURAN *E. coli*

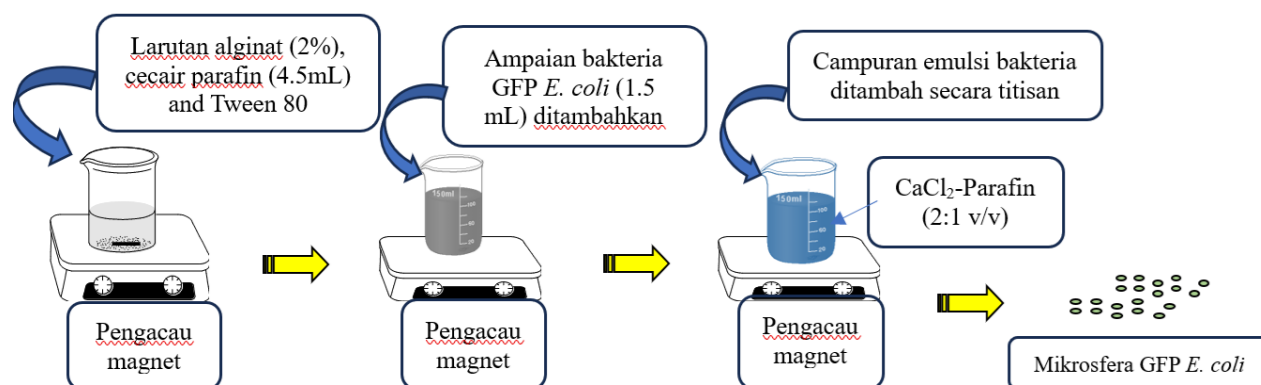
Strain *E. coli* DH5 α^{TM} (Invitrogen, Tokyo, Japan) telah diklonkan ke dalam vektor pRSET-GFP dengan menggunakan tapak sekatan Bam HI dan EcoRI *E. coli*. Larutan ampisilin pada $100\text{ }\mu\text{g/mL}$ telah ditambahkan ke dalam agar Luria-Bertani dan medium kultur cecair untuk menggalakkan pertumbuhan sel GFP *E. coli*. Penanda bio GFP telah dipilih untuk *E. coli* rekombinan kerana ia sangat sensitif (Hanson et al. 2004) dan stabil jika dibandingkan dengan penanda bio lain seperti *luxAB/luc*, *xyl E*, *lac ZY* dan *tfdA* (Rosochacki & Matejczyk 2002; Sorensen, Burmolle & Hansen 2006).

Koloni bakteria GFP *E. coli* tunggal telah diasingkan daripada media agar dan ditumbuh dalam 4 mL medium Luria-Bertani (L-B; 10 g/L tripton, 5 g/L ekstrak yis, 10 g/L NaCl) yang ditambah dengan 4 μL ampisilin untuk kestabilan plasmid. Sel bakteria ditumbuh di bawah goncangan berterusan dalam penggoncang termo berputar pada 250 rpm dan 37°C selama 16 jam. Sebanyak 0.5 mL medium pra-kultur ini kemudiannya disambung

bertumbuh dalam 50 mL medium Luria-Bertani segar yang mengandungi 50 μL ampisilin dan digoncang pada 250 rpm dan 37°C dalam penggoncang termo berputar selama 4 jam. Kemudian, sel GFP *E. coli* dituai melalui pengemparan pada 1000 rpm selama 10 minit dan diampai dalam 10 mL larutan penimbal Hepes pada 5 mM dan pH 7.0.

PEMBANGUNAN BIOSENSOR MIKROB

Mikrosfera alginat disediakan dengan mencampurkan 1.5 mL larutan alginat 2% dalam air ternyahion dengan 4.5 mL cecair parafin dan 2-3 titis Tween 80. Campuran ini kemudiannya dikacau selama 20 minit menggunakan pengacau magnet pada 900 rpm untuk membentuk emulsi campuran. Kira-kira 1.5 mL ampaien bakteria GFP *E. coli* dalam 5 mM larutan penimbal Hepes (pH 7.0) kemudiannya ditambahkan ke dalam campuran emulsi dan dikacau selama 10 minit pada 250 rpm. Kemudian, campuran emulsi bakteria ditambah secara titisan ke dalam 0.15 M CaCl_2 -parafin (2:1 v/v) di bawah pengacauan perlahan pada <100 rpm dengan menggunakan mikropipet diikuti dengan pengemparan pada 1000 rpm selama 10 minit. Sel bakteria yang terperangkap dalam mikrosfera alginat dibasuh sebanyak tiga kali dengan air ternyahion steril dan ditapis terus pada membran selulosa nitrat (saiz liang: $0.45\text{ }\mu\text{m}$ dan diameter: 5 cm) dengan menggunakan pam vakum milipore (Rajah 1). Mikrosfera GFP *E. coli* terpegun pada membran selulosa nitrat kemudiannya dibiarkan semalaman pada suhu 4°C dan ditebuk dalam bentuk bulatan kecil dengan menggunakan penebuk kertas untuk menghasilkan platform biopengesanan berdiameter 5 mm. Semua rangsangan optik biosensor sel bakteria diukur menggunakan spektrofлуorometer gentian optik Perkin Elmer, manakala taburan morfologi dan saiz mikrosfera alginat terkapsul GFP *E. coli* diperhatikan dengan menggunakan mikroskop elektron pengimbasan (SEM, LEO 1450VP).



RAJAH 1. Gambar rajah skematik proses penyediaan biosensor ketoksikan optik berasaskan mikroorganisma sel keseluruhan GFP *E. coli* terpegun dalam mikrosfera alginat melalui mikroenkapsulasi

PENGUKURAN RANGSANGAN BIOSENSOR MIKROB BERPENDARFLUOR

Rangsangan mikrosfera GFP *E. coli* terhadap toksik tunggal [Cu(II), Cd(II), Pb(II), Zn(II), Cr(VI), Co(II), Ni(II), Ag(I), Fe(III), klorpirifos dan 2,4-D] dan campuran toksik (campuran antara Cu(II), Cd(II), Pb(II), Zn(II), klorpirifos dan 2,4-D) telah dinilai berdasarkan perencatan isyarat pendarfluor biosensor mikrob. GFP *E. coli* terpegun telah dihidratkan dengan 20 µL air ternyahion selama 2 minit untuk mengaktifkan sel bakteria terpegun sebelum pengukuran pendarfluor dijalankan. Biosensor tersebut kemudiannya bertindak balas dengan 30 µL analit toksik pada kepekatan 100 mg/L dan dieram selama 4 minit. Sampel kawalan disediakan dengan menggunakan 30 µL air ternyahion pada permukaan biosensor. Rangsangan perencatan pendarfluor mikrosfera GFP *E. coli* diperhatikan sebelum dan selepas pendedahan biosensor mikrob optik terhadap toksik individu dan campuran bahan toksik. Rangsangan biosensor mikrob ketoksikan diperhatikan masing-masing pada panjang gelombang pengujian dan pancaran pendarfluor pada 400±2 nm dan 485±2 nm. Setiap uji kaji dijalankan secara triplikat. Nilai ketoksikan (iaitu peratusan unit pendarfluor relatif, % RFU) untuk analit toksik tunggal dihitung dengan menggunakan formula yang diberikan dalam Persamaan (1), manakala untuk campuran ketoksikan, Persamaan (2) digunakan untuk mendapatkan unit ketoksikan (TU).

$$\% RFU = \frac{\text{Keamatan pendarfluor dengan analit}}{\text{Keamatan pendarfluor tanpa analit}} \times 100\% \quad (1)$$

$$\Sigma TU = \frac{A.EC_{50} \text{ Campuran}}{A.EC_{50} \text{ Tunggal}} + \frac{B.EC_{50} \text{ Campuran}}{B.EC_{50} \text{ Tunggal}} \quad (2)$$

dengan A dan B ialah bahan toksik yang terdapat dalam sel pengukuran. EC_{50} menunjukkan kepekatan berkesan bahan toksik tertentu pada 50% daripada RFUnya. $\Sigma TU=1$ menandakan kesan aditif interaksi sifar antara bahan toksik dalam campuran. Apabila $\Sigma TU>1$, ia menandakan kesan antagonis dan nilai indeks tambahan (AI) dikira dengan persamaan $AI=[\Sigma TU(-1)+1]$. $\Sigma TU<1$ mencadangkan kesan sinergistik dalam campuran ketoksikan dan nilai AInya boleh dianggarkan daripada $AI=[(1/\Sigma TU)-1]$.

PENENTUSAHAN BIOSENSOR MIKROB KETOKSIKAN DENGAN KAEDAH STANDARD MENGGUNAKAN SAMPEL AIR SUNGAI BERTAMBAH ANALIT

Lima sampel air sungai daripada bahagian Sungai Langat yang berbeza telah dikumpul di Kajang, Selangor, Malaysia dan ditapis dengan membran selulosa nitrat. Biosensor ketoksikan optik yang direka berasaskan mikrosfera GFP *E. coli* telah ditentusahkan dengan kaedah spektroskopi penyerapan atom (AAS, Perkin Elmer) bagi penentuan kepekatan logam berat [Cu(II), Cd(II), Pb(II), Zn(II)] dan teknik kromatografi gas-spektrometri jisim (GC-MS, Perkin Elmer) bagi penentuan kepekatan racun perosak (klorpirifos dan 2,4-D) (Momplaisir et al. 2010). Kepekatan larutan toksik piawai yang ditambah secara berasingan bagi setiap analisis sampel air sungai ialah Cu(II): 0.2–5.0 µg/L, Cd(II):0.7–10.0 µg/L, Pb(II):0.7–10.0 µg/L, Zn (II):

5–50 µg/L, klorpirifos:0.2–2.5 µg/L dan 2,4-D:50–500 µg/L. Rangsangan perencatan pendarfluor GFP *E. coli* terpegun diukur sebelum dan selepas biosensor mikrob terdedah kepada pelbagai kepekatan toksik. Peratusan perolehan semula kepekatan analit toksik yang ditambahkan ke dalam sampel air sungai dihitung untuk menilai prestasi perolehan semula biosensor ketoksikan mikrob.

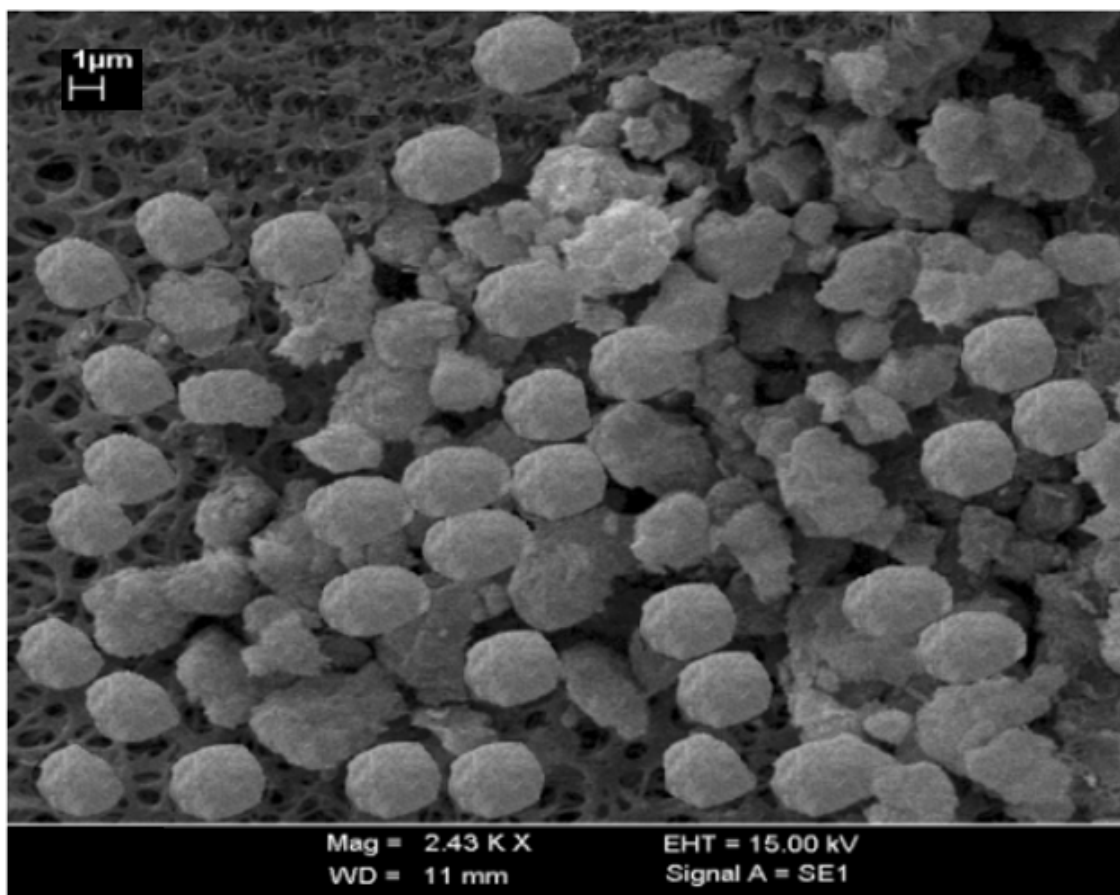
HASIL DAN PERBINCANGAN

SAIZ DAN TABURAN MIKROSFERA ALGINAT

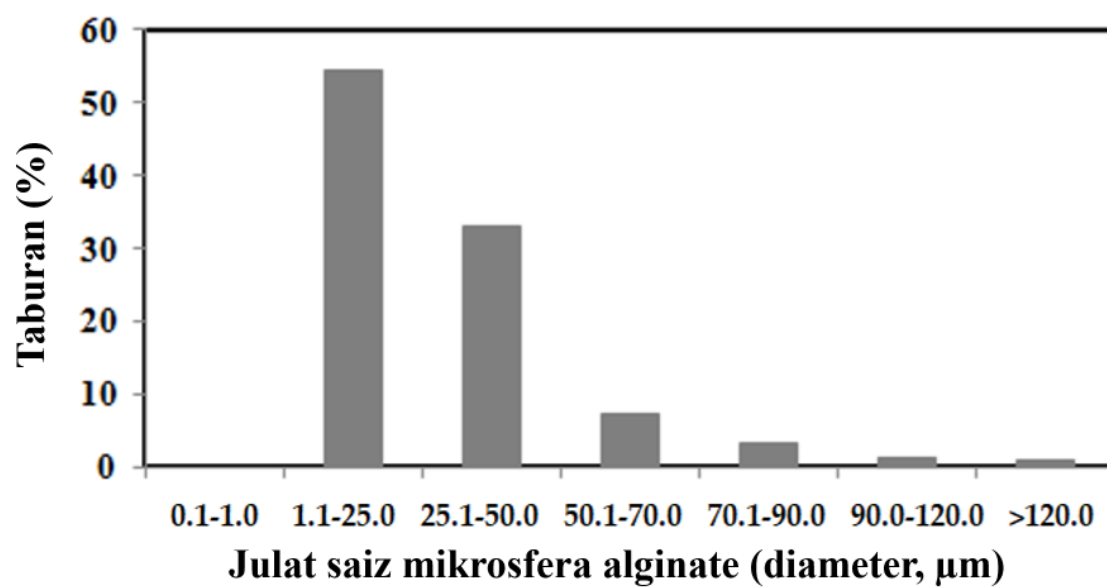
Mikrosfera alginat disediakan dengan kaedah pengemulsian berdasarkan sistem campuran air-dalam-minyak (Khattab et al. 2019). Matriks alginat adalah bersifat hidrofilik dan boleh bertaut-silang dengan kation divalen atau polivalen untuk membentuk matriks alginat tidak melarut. Kation kalsium digunakan secara meluas untuk memaut-silang kepada natrium alginat melalui pengikatan pada unit asid poliuronik alginat (Chan, Jin & Heng 2002). Seperti yang ditunjukkan dalam Rajah 2(a), Imej SEM mendedahkan bahawa mikrozarah alginat bertaut-silang parafin menunjukkan morfologi permukaan sfera kasar dan taburan saiz besar mikrosfera alginat yang telah disediakan, iaitu 1.1-50.0 µm (84%) (Rajah 2(b)). Cecair parafin hidrofobik digunakan untuk membentuk sistem emulsi dengan larutan alginat hidrofilik (Silva et al. 2006). Cecair parafin dipilih kerana ia tidak bertoksik kepada komponen biologi dan boleh meningkatkan kestabilan sel biologi (Hu & Sun 2019). Tween 80 telah ditambah untuk menstabilkan sistem emulsi (air-dalam-minyak) dengan menghalang monomer daripada membentuk titisan yang lebih besar dan membenarkan titisan kecil kekal stabil dalam fasa emulsi (Brown, Srivastava & McShane 2005).

PENGOPTIMUMAN RANGSANGAN BIOSENSOR MIKROB KETOKSIKAN PENDARFLUOR BERASASKAN GFP *E. coli* TERPEGUN MIKROSFERA ALGINAT

Rajah 3(a) menunjukkan spektrum pengujian (400±2 nm) dan pancaran pendarfluor (485±2 nm) mikrosfera alginat terpegun GFP *E. coli* dan tiada isyarat pendarfluor diperhatikan untuk mikrosfera alginat tanpa GFP *E. coli* terpegun. Keamatan pelepasan pendarfluor tertinggi pada 485±2 nm diperoleh untuk mikrosfera GFP *E. coli* tanpa kehadiran ketoksikan (Rajah 3(b)), menunjukkan kumpulan berfungsi tiol (-SH) dalam asid amino sistein (C48S/S147C/Q204C/S65T /Q80R) GFP *E. coli* kekal aktif. Apabila 0.7 µg/L ion Cu(II) ditambah, isyarat pendarfluor pada 485±2 nm merosot sedikit akibat tindak balas antara ion Cu(II) dan kumpulan berfungsi tiol GFP *E. coli* terpegun. Tiada isyarat pendarfluor diperhatikan untuk GFP *E. coli* yang diautoklaf disebabkan penyahaktifan cahaya kromofor GFP oleh kesan pensterilan autoklaf. Seperti yang dijangkakan, *E. coli* DH5α tanpa pengubahsuaian genetik GFP tidak memberikan isyarat optik pendarfluor.

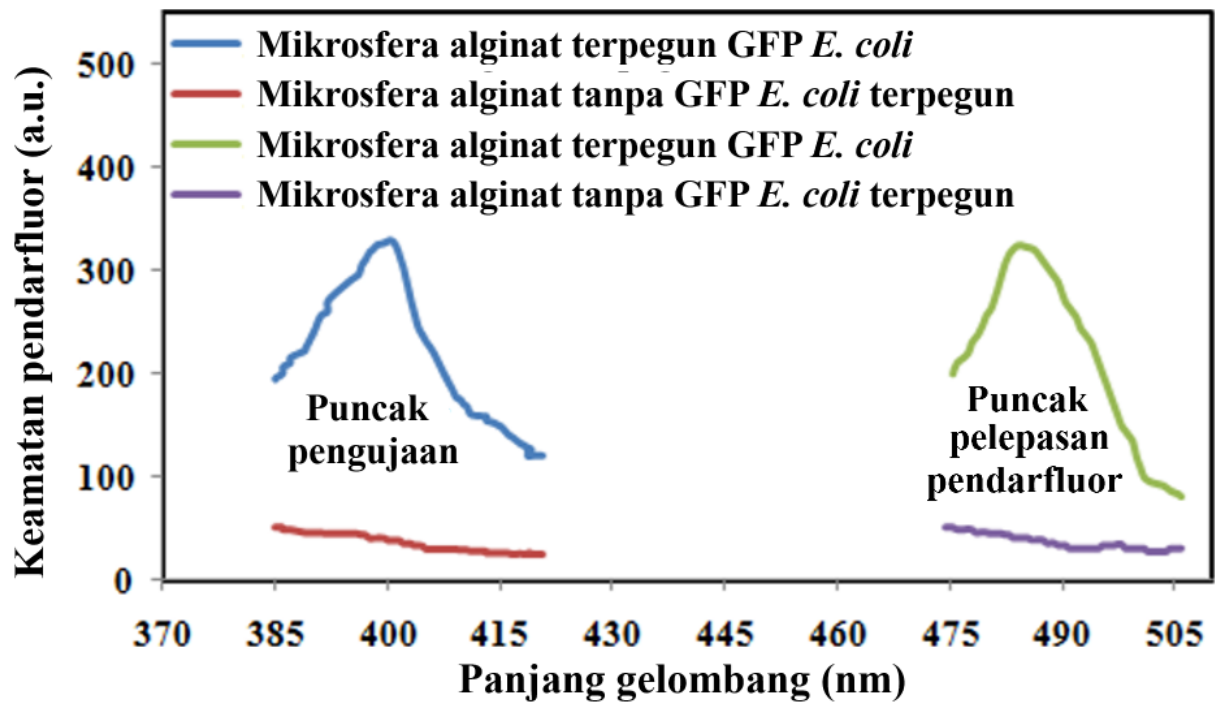


(a)

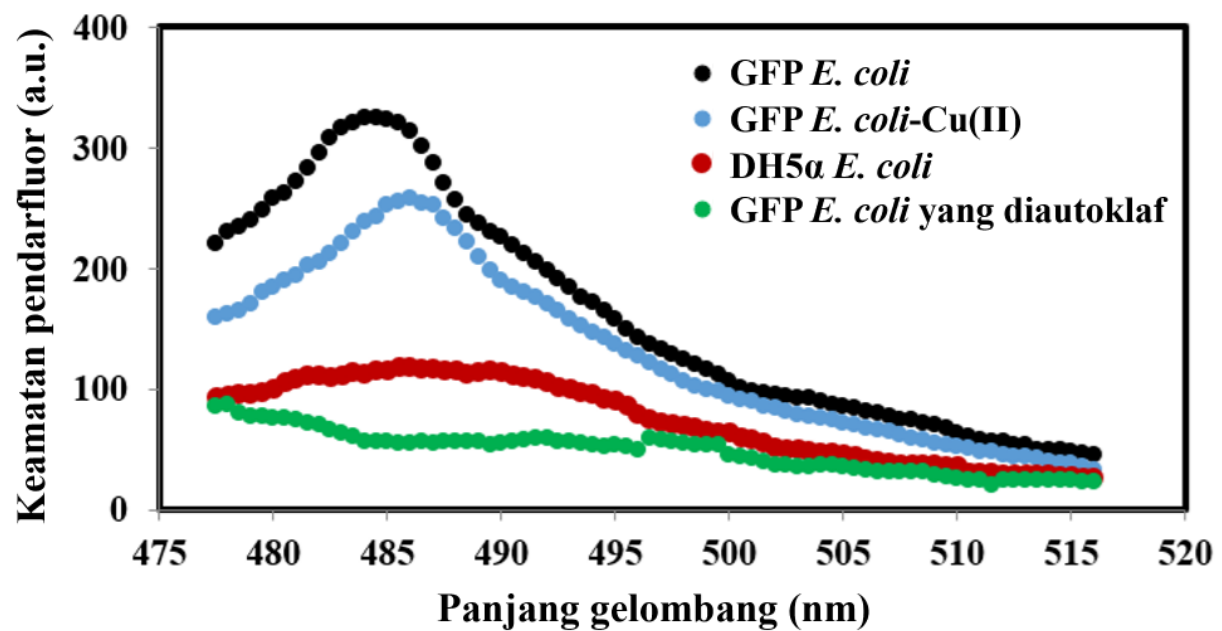


(b)

RAJAH 2. a) Morfologi permukaan mikrosfera alginat yang diperhatikan melalui SEM dan b) corak taburan saiz mikrosfera alginat yang disintesis dengan teknik pengemulsian



(a)



(b)

RAJAH 3. a) Spektrum pengujaan dan pemancaran pendarfluor mikrosfera alginat dengan kehadiran dan ketidakhadiran GFP *E. coli* terpegun. b) Spektrum pelepasan pendarfluor mikrosfera GFP *E. coli*, dengan kepekatan GFP *E. coli*, DH5α *E. coli* dan sel GFP *E. coli* yang diautoklaf berada dalam julat penyerapan 0.8-0.82 Abs (OD 600 nm). Kepekatan ion logam Cu(II) yang digunakan ialah 0.7 µg/L

Keamatan pendarfluor mikrosfera GFP *E. coli* meningkat dengan peningkatan kepekatan GFP *E. coli* yang terkapsul dalam mikrozarrah alginat (Rajah S1(a)) daripada ketumpatan optik (OD) 0.22 Abs kepada 0.80 Abs pada 600 nm. Isyarat pendarfluor yang semakin meningkat boleh dijelaskan oleh had oksigen yang meresap ke dalam sel bakteria terpegun dalam mikrosfera alginat berada dalam keadaan optimum, dengan itu aktiviti metabolik sel bakteria dalam penghasilan DNA, RNA dan enzim tidak terganggu kerana terdapat oksigen yang mencukupi untuk kelestarian metabolisme sel (Kim & Gu 2003). Apabila muatan sel GFP *E. coli* terpegun meningkat antara 0.95 Abs dan 1.25 Abs, rangsangan pendarfluor biosensor mikrob menurun secara mendadak. Ini kerana muatan sel yang tinggi dalam mikrosfera alginat telah menghalang oksigen yang meresap ke dalam sel bakteria terpegun dan menghalang aktiviti metabolik sel di dalamnya (Kim & Gu 2003; Sumner et al. 2006). Fenomena pelindapan pendarfluor juga boleh disebabkan oleh penyerapan pendarfluor oleh sel GFP *E. coli* jiran apabila kepekatan bakteria yang berlebihan digunakan (Sumner et al. 2006). Oleh itu, jumlah sel terpegun yang digunakan dalam uji kaji selanjutnya ditetapkan pada OD 0.80-0.82 Abs.

Kesan kepekatan alginat sebagai matriks pemegun terhadap rangsangan biosensor GFP *E. coli* ditunjukkan dalam Rajah S1(b). Rangsangan biosensor meningkat apabila kepekatan alginat meningkat daripada 0.5-2.0%. Walau bagaimanapun, apabila kepekatan alginat terus meningkat daripada 3.0-10.0%, rangsangan biosensor mikrob menurun. Ini kerana kepekatan alginat yang tinggi cenderung menyebabkan pembentukan gel gelatin. Semakin tinggi kepekatan alginat akan menyebabkan saiz liang mikrosfera alginat yang terhasil semakin kecil dan mengurangkan bekalan oksigen dan nutrien kepada sel mikrob terpegun (Katsanakis, Katsivelis & Kintzois 2009). Keporosan gelatin menjadi lebih tinggi pada kepekatan alginat yang rendah dan ini membolehkan oksigen yang mencukupi meresap ke dalam sel bakteria terpegun untuk proses respirasi sel yang mencukupi. Walau bagaimanapun, kepekatan alginat yang lebih rendah digunakan untuk pemegungan sel akan menyebabkan larut lesap sel bakteria melalui saiz liang yang lebih besar daripada gelatin (Ahmed 2008). Oleh itu, larutan alginat 2.0% telah digunakan dalam penyediaan mikrosfera GFP *E. coli*.

Kepekatan CaCl_2 yang digunakan dalam penyediaan mikrosfera GFP *E. coli* mempunyai kesan yang besar terhadap rangsangan pendarfluor biosensor mikrob. Rangsangan pendarfluor optik biosensor GFP *E. coli* didapati stabil apabila kepekatan CaCl_2 berubah antara 0.05 M dan 0.20 M (Rajah S1(c)). Walau bagaimanapun, apabila kepekatan CaCl_2 meningkat melebihi 0.40 M, rangsangan biosensor mikrob menurun dengan ketara pada panjang gelombang pemancaran pendarfluor 485 ± 2 nm. Ini kerana kepekatan CaCl_2 yang tinggi digunakan semasa fabrikasi biosensor mikrob berasaskan substrat mikrosfera alginat telah menyebabkan pembentukan gelatin secara

pantas dan spontan, dengan itu mengurangkan saiz liang dan keporosan gelatin yang terhasil (Katsanakis, Katsivelis & Kintzois 2009) dan menghalang oksigen dibekalkan kepada sel GFP *E. coli* terpegun. Kesan gangguan persekitaran mikro tersebut ke atas sel bakteria telah mengganggu respirasi sel normal dan semua aktiviti metabolisme sel untuk penghasilan DNA dan enzim (Ahmed 2008). Dengan itu, kepekatan CaCl_2 dikekalkan pada 0.15 M dalam penyediaan mikrosfera alginat di sepanjang kajian ini.

Sisihan piawai relatif (RSD) keboleholangan rangsangan biosensor mikrob pendarfluor terhadap ketoksikan Cu(II), Cd(II), Pb(II), Zn(II), klorpirifos dan 2,4-D dijadualkan dalam Jadual S1. Nilai RSD keboleholangan yang memuaskan diperoleh antara 2.1% dan 4.2% untuk mikrosfera GFP *E. coli* bagi penilaian ketoksikan Cu(II), Cd(II), Pb(II), Zn(II), klorpirifos dan racun rumpai 2,4-D. Keceragaman mikrosfera alginat terkapsul GFP *E. coli* telah menyediakan kawasan permukaan tindak balas yang besar bagi tindak balas dengan pelbagai bahan toksik. Selain itu, sel GFP *E. coli* yang terpegun telah dilindungi oleh lapisan alginat untuk menghindarnya daripada perubahan pH dan suhu yang melampau. Ini membolehkan prestasi keboleholangan biosensor ketoksikan yang lebih tinggi berbanding dengan ujian ketoksikan menggunakan sel bakteria bebas.

Rajah S2 menunjukkan kestabilan rangsangan biosensor mikrob pada panjang gelombang pelepasan pendarfluor 485 ± 2 nm selama 10 minggu. Mikrosfera GFP *E. coli* didapati dapat mengekalkan kestabilan optiknya pada tahap 100% daripada rangsangan pendarfluor optik awalnya untuk lima minggu pertama. Isyarat pendarfluor GFP *E. coli* terpegun menurun ke tahap 86% pada minggu ke-6 tempoh penyimpanannya disebabkan resapan oksigen yang terhad ke dalam mikrosfera alginat terkapsul GFP *E. coli* dan menjejaskan aktiviti metabolik sel bakteria terpegun. Biosensor mikrob kemudian mengekalkan lebih daripada 20% kestabilan optik awalnya pada minggu ke-10.

Kajian perencatan rangsangan biosensor mikrob pendarfluor masing-masing oleh bahan toksik tunggal seperti Cu(II), Cd(II), Pb(II), Zn(II), Cr(VI), Co(II), Ni(II), Ag(I), Fe(III), klorpirifos dan 2,4-D ditunjukkan dalam Rajah S3. Dalam ketidakhadiran bahan toksik, isyarat pendarfluor yang diberikan oleh mikrosfera GFP *E. coli* adalah stabil dengan keamatan pendarfluor yang dicapai pada 100% RFU. Ini disebabkan tiada interaksi antara setiap bahan toksik dan kumpulan berfungsi tiol dalam asid amino sistein GFP *E. coli* terpegun dalam mikrosfera alginat (Hanson et al. 2004; Prasad et al. 2011) dan rangsangan pendarfluor yang dihasilkan oleh mikrosfera GFP *E. coli* kekal pada keamatan maksimumnya. Apabila pelbagai bahan toksik tunggal pada julat kepekatan berbeza ditambahkan secara berasingan kepada biosensor mikrob yang berbeza, rangsangan pendarfluor biosensor mikrob mula menurun. Rangsangan biosensor mikrob

semakin berkurangan apabila kepekatan bahan toksik yang semakin meningkat ditambahkan. Penurunan rangsangan biosensor mikrob pendarfluor adalah disebabkan oleh pengikatan unsur toksik kepada karbon-terikat sulfidril (-SH) dalam kumpulan berfungsi kromofor GFP (Serrano et al. 2006) dan mengakibatkan keamatan pendarfluor yang lebih rendah diperolehi. Jadual S2 menunjukkan prestasi biosensor GFP *E. coli* terhadap pengukuran ketoksikan Cu(II), Cd(II), Pb(II), Zn(II), Cr(VI), Co(II), Ni(II), Ag(I), Fe(III), klorpirifos dan 2,4-D.

Biosensor ketoksikan GFP *E. coli* didapati sensitif terhadap ketoksikan Cu(II), Cd(II), Pb(II), Zn(II), klorpirifos dan 2,4-D berdasarkan ketoksikan EC_{50} yang agak rendah (iaitu di bawah 70 $\mu\text{g/L}$) dan nilai kecerunan yang tinggi. Julat dinamik dan LOD biosensor mikrob terhadap pengukuran bahan toksik ini masing-masing dalam julat kepekatan 1.6-700.0 $\mu\text{g/L}$ dan 0.06-36.50 $\mu\text{g/L}$. Biosensor mikrob menunjukkan sensitiviti yang rendah bagi pengesanan ketoksikan ion Cr(VI), Co(II), Ni(II), Ag(I) dan Fe(III) kerana nilai EC_{50} yang agak tinggi dengan nilai kecerunan yang rendah. Julat dinamik dan LOD biosensor GFP *E. coli* untuk bahan toksik ini masing-masing adalah dalam julat kepekatan 0.5-70.0 mg/L dan 0.43-2.90 mg/L.

Secara amnya, bahan toksik memberikan kesan perencatan pendarfluor kepada mikrosfera GFP *E. coli* dalam urutan Cu>klorpirifos>Cd(II)>Pb(II)>Zn(II)>2,4-D>Cr(IV)>Co(II)>Ni(II)> Ag(I)>Fe(III). Ion Ca(II), K⁺ dan Na⁺ bukan merupakan perencat kepada sel bakteria. Biosensor GFP *E. coli* menunjukkan kepekaan tertinggi terhadap ketoksikan ion Cu(II) kerana kumpulan berfungsi sulfidril asid amino sistein GFP *E. coli* mempunyai afiniti yang tinggi terhadap pengikatan dengan ion Cu(II) untuk membentuk kompleks Cu(II)-sulfur (Serrano et al. 2006) berbanding dengan ion Cd(II), Pb(II) dan Zn(II) (Deng et al. 2010). Sebatian klorpirifos merencatkan GFP *E. coli* melalui interaksi antara kumpulan berfungsi fosfat klorpirifos dan kumpulan berfungsi tiol kromofor GFP, manakala kumpulan berfungsi karboksil (-COOH) racun rumpai 2,4-D merencatkan GFP *E. coli* dengan berinteraksi dengan kumpulan berfungsi amina (-NH₂) atau tiol asid amino sistein.

Perbandingan prestasi biosensor ketoksikan berasaskan mikrosfera alginat dengan kaedah penentuan ketoksikan lain yang dilaporkan sebelum ini untuk pengesanan Cu(II), Cd(II), Pb(II), Zn(II), Cr(VI), Co(II), Ni(II), Ag(I), Fe(II), klorpirifos dan 2,4-D diringkaskan dalam Jadual S3. Biosensor ketoksikan berdasarkan GFP *E. coli* menunjukkan prestasi yang baik dari segi julat rangsangan linear dinamik, LOD dan masa rangsangan jika dibandingkan dengan biosensor fluorimetri (Futra et al. 2014), esei luminometri pembaca plat mikro-96 (Martinez, Heil & Charles 2019), biosensor amperometrik (Guler, Turkoglu & Basi 2017) dan kaedah spektrofotometri kuvet kuarza (Ritcharoon et al. 2020; Whangsuk et al. 2016).

Perbandingan nilai EC_{50} antara biosensor GFP *E. coli* berasaskan mikrosfera alginat dan kaedah penentuan ketoksikan lain yang dilaporkan sebelum ini untuk Cu(II), Cd(II), Pb(II), Zn(II), Cr(VI), Co(II), Ni(II), Ag(I), klorpirifos dan 2,4-D ditunjukkan dalam Jadual S4. Nilai EC_{50} daripada pengukuran bahan toksik ini yang diperolehi dengan menggunakan biosensor GFP *E. coli* adalah lebih rendah jika dibandingkan dengan nilai EC_{50} yang diperolehi menggunakan sel bakteria lain, seperti *Aliivibrio fischeri* (Futra et al. 2014), *Vibrio fischeri* dan *Pseudokirchneriella subcapitata* (Echeverri-Jaramillo et al. 2020) dan *Ceriodaphnia silvestrii* (Silva et al. 2020). Prestasi biosensor mikrob yang dibangunkan adalah jauh lebih baik daripada kaedah analisis ketoksikan yang dilaporkan sebelum ini kerana muatan sel bakteria yang lebih rendah digunakan dalam penyediaan mikrosfera GFP *E. coli* yang dicadangkan, manakala kepekatan sel yang tinggi boleh menyebabkan pelindapan sinaran pendarfluor. Di samping itu, penggunaan mikrosfera alginat sebagai matriks pemegun bioreseptor adalah tidak bertoksik kepada sel GFP *E. coli*. Kaedah mikroenkapsulasi menggunakan mikrosfera alginat untuk memegun sel bakteria membolehkan tapak aktif GFP bebas daripada pengikatan kovalen atau pengikatan taut-silang.

Jadual S5 menunjukkan nilai AI untuk campuran ketoksikan Cu(II), Cd(II), Pb(II), Zn(II), klorpirifos dan 2,4-D pada pelbagai nisbah kepekatan yang ditentukan oleh biosensor GFP *E. coli*. Bahan toksik ini dipilih kerana kesan ketoksikannya yang tinggi terhadap GFP *E. coli*. Kebanyakan rangsangan perencatan biosensor (84-100%) akibat pendedahan kepada pelbagai campuran ketoksikan menunjukkan rangsangan antagonis. Fenomena antagonis berlaku apabila terdapat interaksi intra-unsur sebelum ia bersaing untuk bertindak balas dengan kumpulan berfungsi tiol (iaitu pusat cahaya pendarfluor) (Hanson et al. 2004) molekul sel organik (Dawson et al. 2020). Persaingan yang berlaku antara kation untuk bertindak balas dengan mikrob terpegun boleh mengurangkan kesan ketoksikan pada sel bakteria, justeru, kepekatan campuran unsur toksik yang lebih tinggi diperlukan untuk merencatkan rangsangan biosensor. Ini akan meningkatkan nilai EC_{50} untuk campuran bahan toksik berbanding dengan nilai EC_{50} daripada bahan toksik tunggal.

Pada asasnya, tindak balas antara kation unsur toksik dan molekul sasaran sel adalah berdasarkan mekanisme asid-bes Lewis apabila ion logam bertindak sebagai asid Lewis (iaitu penerima elektron) dan anion kompleks molekul sel organik bertindak sebagai bes Lewis (iaitu pemberi elektron). Berdasarkan Lindahl (2012), molekul sel organik mengandungi bes yang kuat, seperti oksigen (O) dan nitrogen (N) dalam kumpulan berfungsi amino dan sulfur (S) dalam kumpulan berfungsi tiol. Bes Lewis yang kuat biasanya merupakan pusat tindak balas dengan asid Lewis. Oleh itu, persaingan antara ion logam untuk bertindak balas dengan bes Lewis yang sama berlaku.

Kajian menggunakan sel bakteria bebas *P. putida* dan *V. fischeri* untuk pengesanan campuran ketoksikan Cd(II), Hg(II) dan Pb(II) menunjukkan 90% rangsangan antagonis (Schmitz, Eisentrager & Dott 1999), manakala kajian yang menggunakan siput laut *F. candida* untuk pengesanan campuran ketoksikan Ni(II) dan klorpirifos memperoleh 100% rangsangan antagonis (Broerse & Gestel 2010). Walau bagaimanapun, kaedah ini bergantung kepada sel bebas untuk kajian pengukuran ketoksikan dengan masa ujian yang panjang kerana ia mengambil masa beberapa jam tempoh penderaman dan nilai EC_{50} berada pada tahap ppm.

PENENTUSAHAN BIOSENSOR MIKROB DENGAN KAEDAH KONVENSIONAL AAS/GC-MS UNTUK PENGUKURAN KETOKSIKAN AIR

Nilai R^2 yang diperoleh antara biosensor ketoksikan GFP *E. coli* dan kaedah konvensional AAS/GC-MS untuk penentuan kepekatan Cu(II), Cd(II), Pb(II), Zn(II), klorpirifos dan 2,4-D dalam kajian penentusahan adalah dalam julat 0.9983-0.9996. Ini menunjukkan bahawa biosensor mikrob berasaskan mikrosfera GFP *E. coli* adalah setanding dengan kaedah piawai spektroanalisis. Perbandingan nilai perolehan semula yang diperoleh menggunakan biosensor GFP *E. coli* dan kaedah AAS/GC-MS dalam penentuan kepekatan Cu(II), Cd(II), Pb(II), Zn(II), klorpirifos dan 2,4-D yang ditambahkan dalam sampel air sungai ditunjukkan dalam Jadual 6. Nilai perolehan semula yang diperoleh dengan biosensor GFP *E. coli* (82-108%) adalah selari dengan kaedah piawai AAS/GC-MS (85-108%). Kepekatan Cu(II), Cd(II), Pb(II), Zn(II), klorpirifos dan 2,4-D yang diukur oleh biosensor mikrob ketoksikan yang dibangunkan juga dibandingkan secara statistik dengan kaedah instrumen konvensional menggunakan analisis statistik ujian-*t* berdasarkan kaedah yang dilaporkan oleh Phoong dan Phoong (2021). Berdasarkan nilai *t* yang dihitung (Jadual S6), tiada perbezaan yang bererti antara kepekatan toksik yang diukur oleh kedua-dua biosensor dan kaedah konvensional untuk pengesanan bahan toksik Cu(II), Cd(II), Pb(II), Zn(II), klorpirifos dan 2,4-D yang ditambahkan dalam sampel air sungai.

KESIMPULAN

Biosensor mikrob ketoksikan berasaskan platform mikrosfera alginat terpegun GFP *E. coli* yang mudah telah berjaya dibangunkan untuk mengukur ketoksikan logam berat, racun serangga dan racun rumpai dalam sampel air persekitaran. Biosensor berasaskan gentian optik pendarfluor menunjukkan prestasi pengesanan yang lebih baik dari segi julat linear dinamik, LOD, masa rangsangan, keboleholungan dan kestabilan jangka panjang berbanding dengan biosensor mikrob ketoksikan dan kaedah bioesei yang dilaporkan sebelum ini. Sel bakteria GFP *E. coli*

yang terpegun dalam mikrosfera alginat menyediakan luas permukaan yang besar untuk berinteraksi dengan bahan toksik. Prestasi analisis biosensor mikrob berasaskan mikrosfera GFP *E. coli* yang dicadangkan untuk analisis ketoksikan dalam sampel air adalah setanding dengan kaedah konvensional spektroanalisis AAS/GC-MS.

PENGHARGAAN

Penghargaan dan terima kasih yang tidak terhingga kepada Kementerian Sains, Teknologi dan Inovasi Malaysia (MOSTI) yang telah membiayai geran penyelidikan dengan kod projek penyelidikan 04-01-02-SF0418 dan Universiti Kebangsaan Malaysia melalui Geran Penyelidikan OUP-2012-11.

RUJUKAN

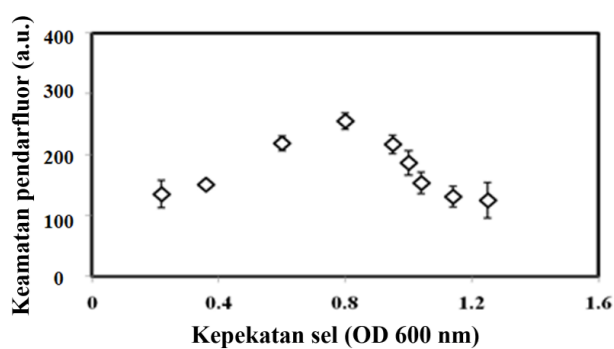
- Abasalizadeh, F., Moghaddam, S.V., Alizadeh, E., Akbari, E., Kashani, E., Fazljou, S.M.B., Torbati, M. & Akbarzadeh, A. 2020. Alginate-based hydrogels as drug delivery vehicles in cancer treatment and their applications in wound dressing and 3D bioprinting. *Journal of Biological Engineering* 14: 8. <https://doi.org/10.1186/s13036-020-0227-7>
- Ahmed, S.A. 2008. Invertase production by *Bacillus macerans* immobilized on calcium alginate beads. *Journal of Applied Sciences* 4(12): 1777-1781.
- Arias-Barreiro, C.R., Okazaki, K., Koutsafitis, A., Inayat-Hussain, S.H., Tani, A., Katsuhara, M., Kimbara, K. & Mori, I.C. 2010. A bacterial biosensor for oxidative stress using the constitutively expressed redox-sensitive protein roGFP2. *Sensors* 10(7): 6290-6306. doi: 10.3390/s100706290
- Broerse, M. & Gestel, C.A.M.V. 2020. Mixture effects of nickel and chlorpyrifos on *Folsomia candida* (Collembola) explained from development of toxicity in time. *Chemosphere* 79(9): 953-957. doi: 10.1016/j.chemosphere.2010.02.032
- Brown, J.Q., Srivastava, R. & McShane, M.J. 2005. Encapsulation of glucose oxidase and an oxygen-quenched fluorophore in poly-electrolyte-coated calcium alginate microspheres as optical glucose sensor systems. *Biosensors and Bioelectronics* 21(1): 212-216. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2004.08.020>
- Cano-Vicent, A., Tuñón-Molina, A., Bakshi, H., Serra, R.S.I., Alfagih, I.M., Tambuwala, M.M. & Serrano-Aroca, A. 2023. Biocompatible alginate film crosslinked with Ca^{2+} and Zn^{2+} possesses antibacterial, antiviral, and anticancer activities. *ACS Omega* 8(27): 24396-24405. <https://doi.org/10.1021/acsomega.3c01935>
- Chakraborty, T., Babu, P.G., Alam, A. & Chaudhari, A. 2008. GFP expressing bacterial biosensor to measure lead contamination in aquatic environment. *Current Science* 94(6): 800-805.

- Chan, L.W. Jin, Y. & Heng, P.W.S. 2002. Cross-linking mechanisms of calcium and zinc in production of alginate microspheres. *International Journal of Pharmaceutics* 242(1-2): 255-258. [https://doi.org/10.1016/S0378-5173\(02\)00169-2](https://doi.org/10.1016/S0378-5173(02)00169-2)
- Chen, S., Chen, X., Su, H., Guo, M. & Liu, H. 2023. Advances in synthetic-biology-based whole-cell biosensors: Principles, genetic modules, and applications in food safety. *International Journal of Molecular Sciences* 24(9): 7989. doi: 10.3390/ijms24097989
- Cui, Z., Luan, X., Jiang, H., Li, Q., Xu, G., Sun, C., Song, Y., Davison, P.A. & Huang, W.E. 2018. Application of a bacterial whole cell biosensor for the rapid detection of cytotoxicity in heavy metal contaminated seawater. *Chemosphere* 200: 322-329. doi: 10.1016/j.chemosphere.2018.02.097
- Dawson, J.J.C., Campbell, C.D., Towers, E., Cameron, C.M. & Paton, G.I. 2006. Linking biosensor responses to Cd, Cu, and Zn partitioning in soils. *Environmental Pollution* 142(3): 493-500. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2005.10.029>
- Deng, X., Xia, Y., Hu, W., Zhang, H. & Shen, Z. 2010. Cadmium-induced oxidative damage and protective effects of N-acetyl-L-cysteine against cadmium toxicity in *Solanum nigrum* L. *Journal of Hazardous Materials* 180(1-3): 722-729. doi: 10.1016/j.jhazmat.2010.04.099
- Echeverri-Jaramillo, G., Jaramillo-Colorado, B., Sabater-Marco, C. & Castillo-López, M.A. 2020. Acute toxicity of chlorpyrifos and its metabolite 3, 5, 6-trichloro-2-pyridinol alone and in combination using a battery of bioassays. *Environmental Science and Pollution Research* 27(26): 32770-32778. doi: 10.1007/s11356-020-09392-x
- Futra, D., Lee, Y.H., Surif, S., Musa, A. & Tan, L.L. 2014. Microencapsulated *Aliivibrio fischeri* in alginate microspheres for monitoring heavy metal toxicity in environmental waters. *Sensors* 14(12): 23248-23268. <https://doi.org/10.3390/s141223248>
- Guler, M., Turkoglu, V. & Basi, Z. 2017. Determination of malathion, methidathion, and chlorpyrifos ethyl pesticides using acetylcholinesterase biosensor based on Nafion/Ag@ rGO-NH₂ nanocomposites. *Electrochimica Acta* 240: 129-135. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2017.04.069>
- Hanson, G.T., Aggeler, R., Oglesbee, D., Cannon, M., Capaldi, R.A., Tsien, R.Y. & Remington, S.J. 2004. Investigating mitochondrial redox potential with redox-sensitive green fluorescent protein indicators. *Journal of Biological Chemistry* 279(13): 13044-13053. doi: 10.1074/jbc.M312846200
- He, J., Zhang, X., Qian, Y., Wang, Q. & Bai, Y. 2022. An engineered quorum-sensing-based whole-cell biosensor for active degradation of organophosphates. *Biosensors and Bioelectronics* 206: 114085. doi: 10.1016/j.bios.2022.114085
- Hu, N. & Sun, H. 2019. A biosensor for hydrogen peroxide based on myoglobin immobilized on calcium alginate microspheres. *Material Sciences* 9(2): 170-176. doi:10.12677/MS.2019.92022
- Jain, M., Yadav, P., Joshi, B., Joshi, A. & Kodgire, P. 2021. Recombinant organophosphorus hydrolase (OPH) expression in *E. coli* for the effective detection of organophosphate pesticides. *Protein Expression and Purification* 186: 105929. doi: 10.1016/j.pep.2021.105929
- Katsanakis, N., Katsivelis, A. & Kintzois, S. 2009. Immobilization of electroporated for fabrication cellular biosensors; physiological effect of the shape of calcium alginate matrices and foetal calf serum. *Sensors* 9(1): 378-385. doi: 10.3390/s90100378
- Khattab, T.A., Fouda, M.M., Abdelrahman, M.S., Othman, S.L., Bin-Jumah, M., Alqaraawi, M.A., Fassam, H.A. & Allam, A.A. 2019. Co-encapsulation of enzyme and tricyanofuran hydrazone into alginate microcapsules incorporated onto cotton fabric as a biosensor for colorimetric recognition of urea. *Reactive and Functional Polymers* 142: 199-206. <https://doi.org/10.1016/j.reactfunctpolym.2019.06.016>
- Khatun, M.A., Hoque, M.A., Zhang, Y., Lu, T., Cui, L., Zhou, N.Y. & Feng, Y. 2018. Bacterial consortium-based sensing system for detecting organophosphorus pesticides. *Analytical Chemistry* 90(17): 10577-10584. doi: 10.1021/acs.analchem.8b02709
- Kim, B.C. & Gu, M.B. 2003. A bioluminescent sensor for high throughput toxicity classification. *Biosensors and Bioelectronics* 18(8): 1015-1021. doi: 10.1016/s0956-5663(02)00220-8
- Kumar, A., Kothari, A., Kumar, P., Singh, A., Tripathi, K., Gairola, J., Pai, M. & Omar, B.J. 2023. *Introduction to Alginate: Biocompatible, Biodegradable, Antimicrobial Nature and Various Applications*. United Kindom: IntechOpen Limited. doi: 10.5772/intechopen.110650
- Lindahl, P.A. 2012. Metal-metal bonds in biology. *Journal of Inorganic Biochemistry* 106(1): 172-178. doi: 10.1016/j.jinorgbio.2011.08.012
- Martinez, A.R., Heil, J.R. & Charles, T.C. 2019. An engineered GFP fluorescent bacterial biosensor for detecting and quantifying silver and copper ions. *Biometals* 32(2): 265-272. doi: 10.1007/s10534-019-00179-3
- Mohseni, M., Abbaszadeh, J., Maghool, S.S. & Chaichi, M.J. 2018. Heavy metals detection using biosensor cells of a novel marine luminescent bacterium *Vibrio* sp. MM1 isolated from the Caspian Sea. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 148: 555-560. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.11.002>
- Momplaisir, G., Rosal, C.G., Heithmar, E.M., Varner, K.E., Riddick, L.A., Bradford, D.F. & Tallent-Halsell, N.G. 2010. Development of a solid phase extraction method for agricultural pesticides in large-volume water samples. *Talanta* 81(4-5): 1380-1386. doi: 10.1016/j.talanta.2010.02.038

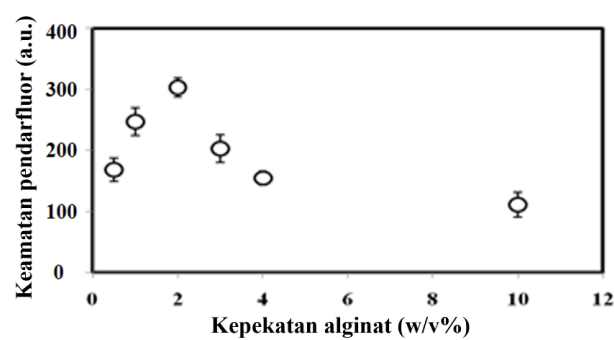
- Moraskie, M., Roshid, M.H.O., O'Connor, G., Dikici, E., Zingg, J., Deo, S. & Daunert, S. 2021. Microbial whole-cell biosensors: Current applications, challenges, and future perspectives. *Biosensors and Bioelectronics* 191: 113359. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2021.113359>
- Nourmohammadi, E., Hosseinkhani, S., Nedaeinia, R., Khoshdel-Sarkarizi, H., Nedaeinia, M., Ranjbar, M., Ebrahimi, N., Farjami, Z., Nourmohammadi, M., Mahmoudi, A., Goli, M., Ferns, G.A. & Sadeghizadeh, M. 2020. Construction of a sensitive and specific lead biosensor using a genetically engineered bacterial system with a luciferase gene reporter controlled by pbr and cadA promoters. *Biomedical Engineering Online* 19(1): 79. doi: 10.1186/s12938-020-00816-w
- Ooi, L., Lee, Y.H. & Mori, I.C. 2015. A high-throughput oxidative stress biosensor based on *Escherichia coli* roGFP2 cells immobilized in a *k*-carrageenan matrix. *Sensors* 15(2): 2354-2368. doi: 10.3390/s150202354
- Phoong, S.Y. & Phoong, S.W. 2021. *Inferential Statistics: Hypothesis Testing, Quantitative Data Analysis Using SPSS Statistic*. Malaysia: Malaysian Scholarly Publishing Council.
- Prasad, J., Joshi, A., Jayant, R.D. & Srivastava, R. 2011. Cholesterol biosensors based on oxygen sensing alginate-silica microspheres. *Biotechnology and Bioengineering* 108: 2011-2021. doi: 10.1002/bit.23143
- Rathnayake, I.V.N., Megharaj, M. & Naidu, R. 2021. Green fluorescent protein based whole cell bacterial biosensor for the detection of bioavailable heavy metals in soil environment. *Environmental Technology & Innovation* 23: 101785. <https://doi.org/10.1016/j.eti.2021.101785>
- Raus, R.A., Nawawi, F.M.F.W. & Nasaruddin, R.R. 2021. Alginate and alginate composites for biomedical applications. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences* 16(3): 280-306. <https://doi.org/10.1016/j.ajps.2020.10.001>
- Ritcharoon, B., Sallabhan, R., Toewiwat, N., Mongkolsuk, S. & Loprasert, S. 2020. Detection of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid herbicide using a FGE-sulfatase based whole-cell *Agrobacterium* biosensor. *Journal of Microbiological Methods* 175: 105997. doi: 10.1016/j.mimet.2020.105997
- Rosochacki, S.J. & Matejczyk, M. 2002. Green fluorescent protein as a molecular marker in microbiology. *Acta Microbiologica Polonica* 51(3): 205-216.
- Sahoo, D.R. & Biswal, T. 2021. Alginate and its application to tissue engineering. *SN Applied Sciences* 3: 30. <https://doi.org/10.1007/s42452-020-04096-w>
- Schmitz, R.P.H., Eisentrager, A. & Dott, W. 1999. Agonistic and antagonistic toxic effect observed with miniaturized growth and luminescence inhibition assays. *Chemosphere* 38(1): 79-95. doi: 10.1016/s0045-6535(98)00175-1
- Serrano, N., Sestakova, I., Diaz-Cruz, J.M. & Arino, C. 2006. Adsorptive accumulation in constant current stripping chronopotentiometry as an alternative for the electrochemical study of metal complexation by thiol-containing peptides. *Journal of Electroanalytical Chemistry* 591(1): 105-117. <https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2006.03.038>
- Silva, C.M., Ribeiro, A.J., Figueiredo, I.V., Goncalves, A.R. & Veiga, F. 2006. Alginate microspheres prepared by internal gelation: Development and effect on insulin stability. *International Journal of Pharmaceutics* 311(1-2): 1-10. doi: 10.1016/j.ijpharm.2005.10.050
- Silva, L.C., Moreira, R.A., Pinto, T.J., Ogura, A.P., Yoshii, M.P., Lopes, L.F., Montagner, C.C., Goulart, B.V., Daam, M.A. & Espindola, E.I. 2020. Acute and chronic toxicity of 2, 4-D and fipronil formulations (individually and in mixture) to the Neotropical cladoceran *Ceriodaphnia silvestrii*. *Ecotoxicology* 29(9): 1462-1475. doi: 10.1007/s10646-020-02275-4
- Sorensen, S.J., Burmolle, M. & Hansen, L.H. 2006. Making bio-sense of toxicity: New developments in whole-cell biosensors. *Current Opinion in Biotechnology* 17(1): 11-16. doi:10.1016/j.copbio.2005.12.007
- Sumner, J., Westberg, N.M., Stoddard, A.K., Hurst, T.K., Cremer, M., Thompson, R.B., Fierke, C.A. & Kopelman, R. 2006. DsRed a highly sensitive, selective and reversible fluorescence-based biosensor for both Cu⁺ and Cu²⁺ ions. *Biosensors and Bioelectronics* 21(7): 1302-1308. doi: 10.1016/j.bios.2005.04.023
- Valenzuela-García, L.I., Alarcón-Herrera, M.T., Ayala-García, V.M., Barraza-Salas, M., Salas-Pacheco, J.M., Díaz-Valles, J.F. & Pedraza-Reyes, M. 2023. *Environmental Microbiology* 11(4): e00432-23. doi: <https://doi.org/10.1128/spectrum.00432-23>
- Vopálenská, I., Váchová, L. & Palková, Z. 2015. New biosensor for detection of copper ions in water based on immobilized genetically modified yeast cells. *Biosensors and Bioelectronics* 72: 160-167. doi: 10.1016/j.bios.2015.05.006
- Wang, G.H., Cheng, C.Y., Tsai, T.H., Chiang, P.K. & Chung, Y.C. 2021. Highly sensitive luminescent bioassay using recombinant *Escherichia coli* biosensor for rapid detection of low Cr (VI) concentration in environmental water. *Biosensors* 11(10): 357. <https://doi.org/10.3390/bios11100357>
- Whangsuk, W., Thiengmag, S., Dubbs, J., Mongkolsuk, S. & Loprasert, S. 2016. Specific detection of the pesticide chlorpyrifos by a sensitive genetic-based whole cell biosensor. *Analytical Biochemistry* 493: 11-13. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2015.09.022>
- Wu, Y., Wang, C., Wang, D. & Wei, N. 2021. A whole-cell biosensor for point-of-care detection of waterborne bacterial pathogens. *ACS Synthetic Biology* 10(2): 333-344. <https://doi.org/10.1021/acssynbio.0c00491>

- Yu, D., Bai, L., Zhai, J., Wang, Y. & Dong, S. 2017. Toxicity detection in water containing heavy metal ions with a self-powered microbial fuel cell-based biosensor. *Talanta* 168: 210-216. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2017.03.048>
- Yu, D., Zhang, H., Bai, L., Fang, Y., Liu, C., Zhang, H., Li, T., Han, L., Yu, Y., Hongwen, Y. & Dong, S. 2020. Visual detection of the toxicity of wastewater containing heavy metal ions using a microbial fuel cell biosensor with a Prussian blue cathode. *Sensors and Actuators B: Chemical* 302: 127177. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2019.127177>
- Zevallos-Aliaga, D., Graeve, S.D., Obando-Chavez, P., Vaccari, N.A., Gao, Y., Peeters, T. & Guerra, D.G. 2024. Highly sensitive whole-cell mercury biosensors for environmental monitoring. *Biosensors* 14(5): 246. <https://doi.org/10.3390/bios14050246>

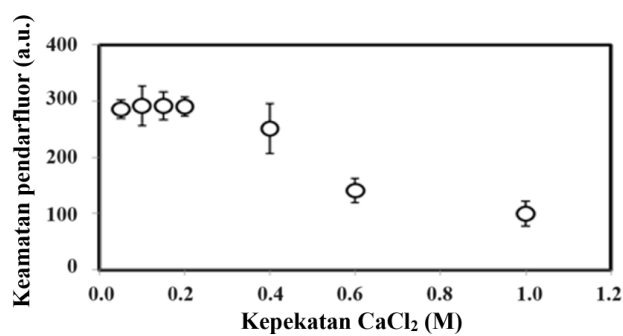
*Pengarang untuk surat-menyurat; email: leeyookheng@yahoo.co.uk



(a)

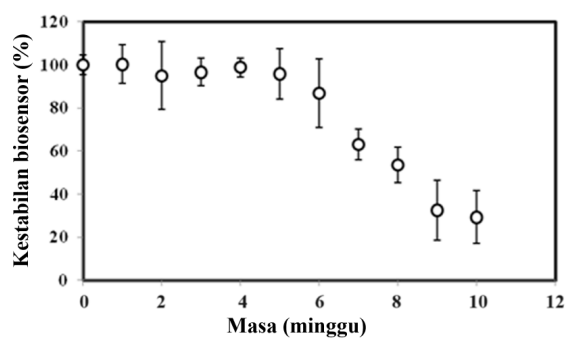


(b)

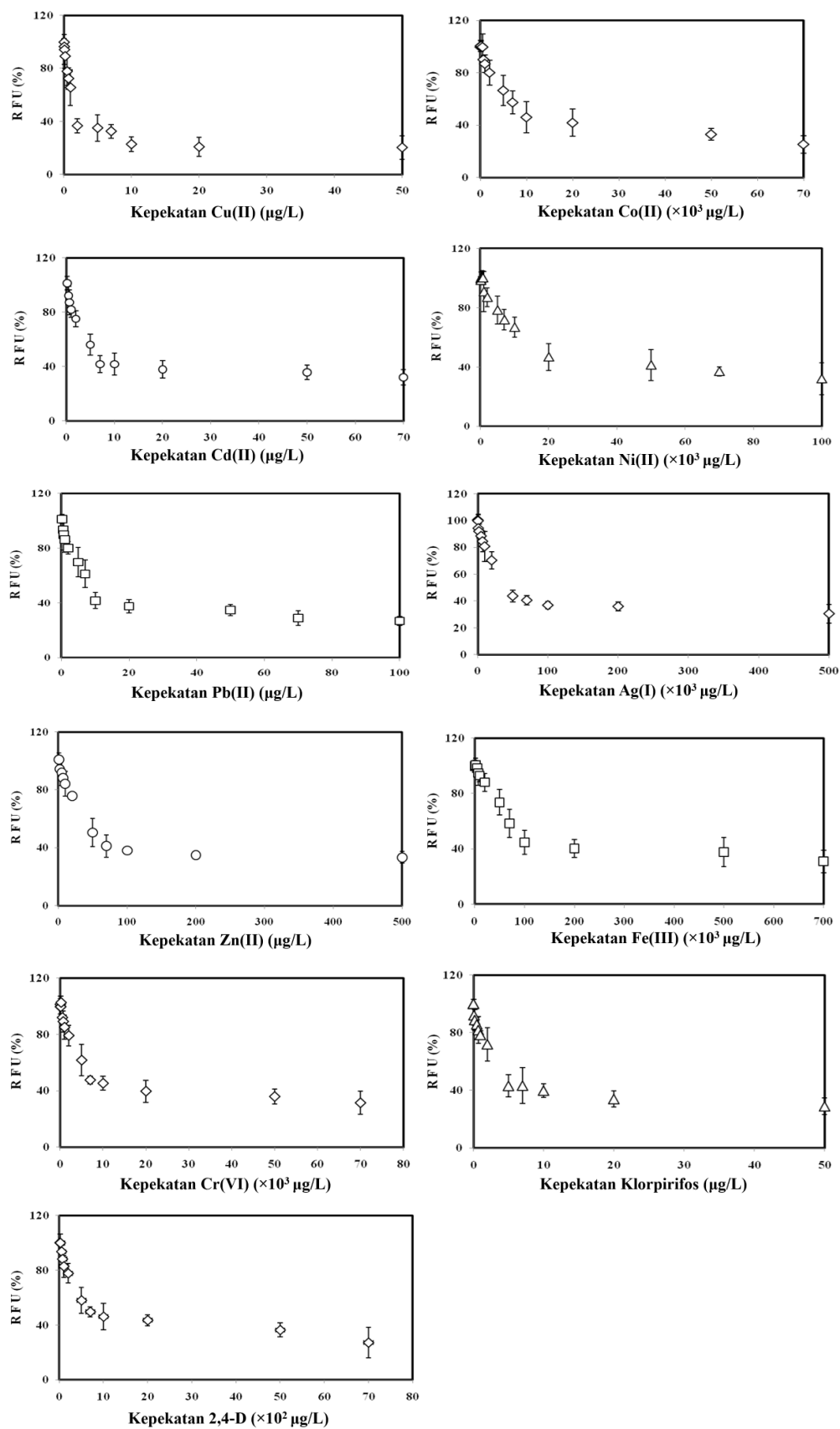


(c)

RAJAH S1. Kesan a) muatan GFP *E. coli*, b) alginat c) dan kepekatan CaCl₂ terhadap rangsangan pendarfluor mikrosfera GFP *E. coli* pada panjang gelombang pemancaran pendarfluor 485±2 nm



RAJAH S2. Kestabilan jangka masa panjang biosensor mikrob ketoksikan berasaskan sel GFP *E. coli* yang terkapsul dalam mikrosfera alginat



RAJAH S3. Profil perencatan rangsangan pendarfluor biosensor mikroba dalam terdedah kepada ketoksikan Cu(II), Cd(II), Pb(II), Zn(II), Cr(VI), Co(II), Ni(II), Ag(I), Fe(III), klorpirifos dan 2,4-D

JADUAL S1. Nilai RSD keboleholangan biosensor mikrob ketoksikan berasaskan GFP *E. coli* terpegun dalam mikrosfera alginat terhadap pendedahan kepada ketoksikan Cu(II), Cd(II), Pb(II), Zn(II), klorpirifos dan 2,4- D selama 1 min

Bahan toksik	Kepekatan ($\mu\text{g/L}$)	RSD keboleholangan ($n=8$, %)
Cu(II)	0.1	4.2
	0.5	3.6
Cd(II)	1.0	2.3
	5.0	4.1
Pb(II)	2.0	3.8
	7.0	2.1
Zn(II)	10.0	2.2
	50.0	3.1
Klorpirifos	0.1	3.5
	0.5	3.4
2,4-D	100.0	2.9
	500.0	4.0

JADUAL S2. Prestasi biosensor GFP *E. coli* terhadap pengukuran ketoksikan Cu(II), Cd(II), Pb(II), Zn(II), Cr(VI), Co(II), Ni(II), Ag(I), Fe(III), klorpirifos dan 2,4-D

Bahan toksik	Julat dinamik ($\mu\text{g/L}$)	Had pengesanan ($\mu\text{g/L}$)	Kecerunan [% RFU/ $\mu\text{g/L}$]	EC ₅₀ ($\mu\text{g/L}$)	R ²
Cu(II)	0.07–2.00	0.06	-25.201	1.6	0.990
Cd(II)	0.50–7.00	0.24	-7.5134	5.8	0.994
Pb(II)	0.50–10.00	0.31	-5.0108	8.7	0.988
Zn(II)	2.00–70.00	1.63	-0.8024	50.0	0.988
Cr(VI)	(0.50–7.00) $\times 10^3$	0.43 $\times 10^3$	-0.0065	6.7 $\times 10^3$	0.994
Co(II)	(0.70–10.00) $\times 10^3$	0.50 $\times 10^3$	-0.0047	8.8 $\times 10^3$	0.991
Ni(II)	(0.10–2.00) $\times 10^4$	0.79 $\times 10^3$	-0.0023	1.8 $\times 10^4$	0.984
Ag(I)	(0.10–5.00) $\times 10^4$	0.10 $\times 10^4$	-0.0010	4.2 $\times 10^4$	0.989
Fe(III)	(0.50–7.00) $\times 10^4$	0.29 $\times 10^4$	-0.0006	7.0 $\times 10^4$	0.991
Klorpirifos	0.10–5.00	0.07	-15.615	4.5	0.989
2,4-D	50.00–700.00	36.50	-0.062	700.0	0.998

JADUAL S4. Perbandingan nilai EC₅₀ antara biosensor GFP *E. coli* berasaskan mikrosfera alginat dan kaedah analisis ketoksikan lain yang dilaporkan sebelum ini untuk penentuan ketoksikan Cu(II), Cd(II), Pb(II), Zn(II), Cr(VI), Co (II), Ni(II), Ag(I), Fe(III), klorpirifos dan 2,4-D

EC ₅₀ ($\mu\text{g/L}$)											Masa pengeraman (min)	Rujukan
Cu(II)	Cd(II)	Pb(II)	Zn(II)	Cr(VI)	Co(II)	Ni(II)	Ag(I)	Fe(III)	Klorpirifos	2,4-D		
0.06	0.24	0.31	1.63	0.43 $\times 10^3$	0.50 $\times 10^3$	0.79 $\times 10^3$	0.10 $\times 10^4$	0.29 $\times 10^4$	0.07	36.60	4	Kajian ini
1.70 $\times 10^2$	6.30 $\times 10^3$	0.70 $\times 10^3$	6.00 $\times 10^2$	1.80 $\times 10^4$	6.60 $\times 10^4$	6.60 $\times 10^4$	6.00 $\times 10^4$	7.00 $\times 10^4$	-	-	6	Mohseni et al. (2018)
-	-	-	-	-	-	-	-	-	2.90 $\times 10^3$	-	15	Echeverri-Jaramillo et al. (2020)
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	169.18 $\times 10^3$	2880	Silva et al. (2020)

JADUAL S3. Perbandingan prestasi biosensor ketoksikan berasaskan mikrosfera alginat dengan kaedah ujian ketoksikan lain yang dilaporkan sebelum ini untuk pengesanan Cu(II), Cd(II), Pb(II), Zn(II), Cr(VI), Ni(II), Co(II), Ag(I), Fe(III), klorpirifos dan 2,4-D

Bahan toksik	Komponen biologi	Matriks pemegunan	Julat linear ($\mu\text{g/L}$)	LOD ($\mu\text{g/L}$)	Masa rangsangan (min)	Rujukan
Cu(II)	GFP <i>E. coli</i>	Mikrosfera alginat	0.07–2.00	0.06	4	Kajian ini
	<i>A. fischeri</i>	Mikrosfera alginat	$(0.01\text{--}672.00)\times 10^2$	6.40	6	Futra et al. (2014)
	GFP <i>E. coli</i>	Kultur sel bebas	$(0.71\text{--}21.30)\times 10^3$	0.71×10^3	1140	Martinez, Heil & Charles (2019)
Cd(II)	<i>E. coli</i> GFP	Mikrosfera alginat	0.50–7.00	0.24	4	Kajian ini
	<i>A. fischeri</i>	Mikrosfera alginat	$(0.20\text{--}5.00)\times 10^3$	1.56×10^2	6	Futra et al. (2014)
Pb(II)	GFP <i>E. coli</i>	Mikrosfera alginat	0.50–10.00	0.31	4	Kajian ini
	<i>A. fischeri</i>	Mikrosfera alginat	$(0.50\text{--}7.00)\times 10^3$	0.47×10^2	6	Futra et al. (2014)
Zn(II)	GFP <i>E. coli</i>	Mikrosfera alginat	2.00–70.00	1.63	4	Kajian ini
	<i>A. fischeri</i>	Mikrosfera alginat	$(0.50\text{--}7.00)\times 10^2$	0.32×10^2	6	Futra et al. (2014)
Cr(VI)	GFP <i>E. coli</i>	Mikrosfera alginat	$(0.50\text{--}10.00)\times 10^3$	0.43×10^3	4	Kajian ini
	<i>A. fischeri</i>	Mikrosfera alginat	$(0.10\text{--}2.00)\times 10^4$	1.00×10^3	6	Futra et al. (2014)
Co(II)	GFP <i>E. coli</i>	Mikrosfera alginat	$(0.70\text{--}10.00)\times 10^3$	0.50×10^3	4	Kajian ini
	<i>A. fischeri</i>	Mikrosfera alginat	$(0.50\text{--}5.00)\times 10^4$	1.70×10^3	6	Futra et al. (2014)
Ni(II)	<i>E. coli</i> GFP	Mikrosfera alginat	$(0.10\text{--}2.00)\times 10^4$	0.79×10^3	4	Kajian ini
	<i>A. fischeri</i>	Mikrosfera alginat	$(0.50\text{--}7.00)\times 10^4$	2.80×10^3	6	Futra et al. (2014)
Ag(I)	<i>E. coli</i> GFP	Mikrosfera alginat	$(0.10\text{--}5.00)\times 10^4$	1.00×10^3	4	Kajian ini
	<i>A. fischeri</i>	Mikrosfera alginat	$(0.20\text{--}7.00)\times 10^4$	1.80×10^3	6	Futra et al. (2014)
	GFP <i>E. coli</i>	Kultur sel bebas	$(0.20\text{--}10.70)\times 10^4$	1.40×10^3	1140	Martinez, Heil & Charles (2019)
Fe(III)	<i>E. coli</i> GFP	Mikrosfera alginat	$(0.50\text{--}7.00)\times 10^4$	0.29×10^4	4	Kajian ini
	<i>A. fischeri</i>	Mikrosfera alginat	$(0.50\text{--}7.00)\times 10^4$	0.31×10^4	6	Futra et al. (2014)
Klorpirifos	<i>E. coli</i> GFP	Mikrosfera alginat	0.10–5.00	0.07	4	Kajian ini
	<i>Sinorhizobium meliloti</i> (chPA)	Kultur sel bebas	0.90–178.00	0.89	240	Whangsuk et al. (2016)
	<i>Acetylcholinesterase</i>	Nafion-grafena oksida	21.00–122.00	14.00	30	Guler, Turkoglu & Basi (2017)
2,4-D	<i>E. coli</i> GFP	Mikrosfera alginat	50.00–700.00	36.50	4	Kajian ini
	<i>E. coli</i> (CadR)	Kultur sel bebas	55.40–3550.00	55.40	1140	Ritcharoon et al. (2020)

JADUAL S5. Nilai AI bagi campuran ketoksikan Cu(II), Cd(II), Pb(II), Zn(II), klorpirifos dan 2,4-D pada pelbagai nisbah kepekatan yang diperoleh menggunakan biosensor ketoksikan GFP *E. coli* terbangun

Campuran bahan toksik	AI		
	1 : 1	2 : 1	1 : 2 w/w
Pb(II)+Zn(II)	-0.36	-0.25	-0.57
Cu(II)+Zn(II)	-2.26	-1.94	-2.00
Cu(II)+Pb(II)	-2.64	-2.16	-2.13
Cd(II)+Zn(II)	-0.74	-1.20	-1.56
Cd(II)+Pb(II)	-1.13	-1.70	-3.42
Cd(II)+Cu(II)	-2.97	-1.00	-1.75
Cu(II)+Klorpirifos	+0.68	-0.49	-1.70
Cd(II)+Klorpirifos	-1.42	-1.24	-1.87
Pb(II)+Klorpirifos	-1.38	-1.24	-1.96
Zn(II)+Klorpirifos	-1.02	-0.81	-2.26
Cd(II)+2,4-D	-1.14	-1.10	-4.34
Cu(II)+2,4-D	+0.87	-0.28	-1.72
Pb(II)+2,4-D	-0.47	-1.25	-1.96
Klorpirifos+2,4-D	-1.16	-1.42	-0.67
(1:1:1 to 1:1:1:1:1:1) w/w			
Cu(II)+Cd(II)+Pb(II)	-3.10		
Cu(II)+Cd(II)+Zn(II)	-4.58		
Cu(II)+Cd(II)+Klorpirifos	-4.34		
Cu(II)+Cd(II)+2,4-D	-6.67		
Cu(II)+Klorpirifos +2,4-D	-5.51		
Cu(II)+Cd(II)+Pb(II)+Zn(II)	-3.38		
Cu(II)+Cd(II)+Pb(II)+Klorpirifos	-6.49		
Cu(II)+Cd(II)+Pb(II)+2,4-D	-4.75		
Cu(II)+Pb(II)+Klorpirifos +2,4-D	-3.71		
Cu(II)+Cd(II)+Klorpirifos +2,4-D	-9.05		
Cu(II)+Cd(II)+Pb(II)+Zn(II)+Klorpirifos	-6.89		
Cu(II)+Cd(II)+Pb(II)+Zn(II)+2,4-D	-4.90		
Cu(II)+Cd(II)+Pb(II)+Zn(II)+Klorpirifos +2,4-D	-6.48		

AI>0 menunjukkan kesan sinergistik; AI<0 menunjukkan kesan antagonis

JADUAL S6. Perbandingan nilai pemulihan semula yang diperoleh oleh biosensor GFP *E. coli* dan kaedah AAS/GC-MS untuk pengukuran ketoksikan Cu(II), Cd(II), Pb(II), Zn(II), kloripirifos dan 2,4-D dalam sampel air sungai yang ditambah analit

Bahan toksik	Analit ditambah (µg/L)	Biosensor (n=3)		AAS/GC-MS (n=3)		Nilai <i>t</i>
		Kepekatan analit diukur (µg/L)	Perolehan semula (%)	Kepekatan analit diukur (µg/L)	Perolehan semula (%)	
Cu(II)	0.00	7.79±1.62	-	7.51±0.67	-	0.41
	0.20	8.01±2.18	108.00	7.71±0.45	98.00	0.27
	0.50	8.31±2.67	101.40	8.02±0.51	102.00	0.22
	0.70	8.39±3.17	86.00	8.23±1.22	98.30	0.10
	1.00	8.63±3.36	84.40	8.44±0.60	92.90	0.09
	5.00	12.31±2.20	90.50	12.01±0.48	89.20	0.16
Cd(II)	0.00	5.76±1.30	-	5.53±0.95	-	0.37
	0.70	6.46±2.16	98.60	6.20±0.43	95.60	80.19
	2.00	7.86±2.88	104.70	7.63±0.73	105.20	0.15
	5.00	10.89±3.90	102.30	10.38±0.98	97.10	0.29
	7.00	11.76±3.14	85.50	11.64±1.31	87.30	0.07
	10.00	15.40±3.43	96.30	15.26±1.30	97.30	0.11
Pb(II)	0.00	8.87±1.03	-	9.11±0.24	-	0.41
	0.70	9.74±1.05	87.10	10.05±0.18	94.30	0.63
	2.00	10.55±1.69	84.10	10.83±0.92	87.10	0.25
	5.00	14.18±3.94	106.10	14.29±1.61	103.70	0.04
	7.00	16.10±3.17	103.20	16.46±1.72	105.00	0.12
	10.00	18.80±3.95	99.30	18.96±1.31	98.500	0.68
Zn(II)	0.00	12.87±3.19	-	13.62±1.22	-	0.44
	5.00	18.17±6.52	106.10	18.90±2.19	105.60	0.29
	7.00	19.48±7.61	94.40	20.46±1.99	98.00	0.25
	10.00	21.31±10.27	84.50	23.49±4.44	88.70	0.18
	15.00	28.27±10.72	102.60	28.01±2.47	95.90	0.05
	20.00	32.54±13.41	98.30	34.12±2.80	102.50	0.17
	50.00	60.04±22.08	94.30	62.65±5.93	98.10	0.25
Klorpirifos	0.20	0.19±0.04	99.20	0.19±0.02	97.00	0.28
	0.50	0.53±0.11	106.40	0.52±0.06	104.10	0.32
	0.70	0.73±0.13	104.90	0.72±0.06	102.90	0.33
	1.00	0.96±0.13	95.90	0.99±0.09	98.80	0.26
	2.00	1.85±0.23	92.50	1.91±0.22	95.70	0.38
	2.50	2.17±0.34	86.80	2.22±0.29	88.70	0.11
2,4-D	0.00	0.00	-	0.00	-	-
	50.00	48.75±5.12	97.50	48.17±4.05	96.40	0.20
	70.00	60.98±6.76	87.10	61.72±4.62	88.20	0.59
	80.00	75.14±7.24	93.90	73.39±7.16	91.70	0.21
	100.00	98.58±9.97	98.60	102.28±7.91	102.30	0.46
	200.00	214.21±25.16	107.10	208.39±15.67	104.20	0.28
	500.00	483.19±45.72	96.60	493.06±32.43	98.60	0.52

Nilai genting, $t_4=2.78$ ($P=0.05$). Persamaan linear $[Cu(II)]_{\text{biosensor}}$ lawan $[Cu(II)]_{\text{AAS}}$, $[Cd(II)]_{\text{biosensor}}$ lawan $[Cd(II)]_{\text{AAS}}$, $[Pb(II)]_{\text{biosensor}}$ lawan $[Pb(II)]_{\text{AAS}}$, $[Zn(II)]_{\text{biosensor}}$ lawan $[Zn(II)]_{\text{AAS}}$, $[chlorpyrifos]_{\text{biosensor}}$ lawan $[chlorpyrifos]_{\text{GC-MS}}$ dan $[2,4-D]_{\text{biosensor}}$ lawan $[2,4-D]_{\text{GC-MS}}$ masing-masing adalah $[Cu(II)]_{\text{biosensor}}=0.984[Cu(II)]_{\text{AAS}}-0.0433$, $[Cd(II)]_{\text{biosensor}}=1.012[Cd(II)]_{\text{AAS}}-0.0675$, $[Pb(II)]_{\text{biosensor}}=0.989[Pb(II)]_{\text{AAS}}-0.068$, $[Zn(II)]_{\text{biosensor}}=1.0436[Zn(II)]_{\text{AAS}}-0.3612$, $[Klorpirifos]_{\text{biosensor}}=1.0354[klorpirifos]_{\text{GC-MS}}-0.0176$ dan $[2,4-D]_{\text{biosensor}}=0.9926[2,4-D]_{\text{GC-MS}}-0.0344$. Nilai R^2 bagi Cu(II), Cd(II), Pb(II), Zn(II), klorpirifos dan 2,4-D masing-masing adalah 0.9992, 0.9983, 0.9993, 0.9984, 0.9996 dan 0.9994. Persamaan linear digunakan untuk menghitung kepekatan Cu(II), Cd(II), Pb(II), Zn(II), klorpirifos dan 2,4-D masing-masing adalah ($Y=-30.237x+95.912$), ($Y=-5.512x+97.106$), ($Y=-4.016x+99.54$), ($Y=-0.7507x+100.54$), ($Y=-15.613x+95.843$) dan ($Y=-0.0619x+91.962$)