

CHARACTERISATION OF CHOLINESTERASE ACTIVITY FROM ASIAN SWAMP EEL; *MONOPTERUS ALBUS*, AND TESTING ITS CAPABILITIES AS A BIOSENSOR ON METAL ION CONTAMINATION

PENCIRIAN AKTIVITI KOLINESTERES DARI OTOT BELUT SAWAH; *MONOPTERUS ALBUS*, DAN PENGUJIAN KEUPAYAANNYA SEBAGAI BIOPENANDA TERHADAP PENCEMARAN ION LOGAM

Siti Aishah Muhammad Khalidi^a, Nureen Nordin^a, Nur Hazrina Nurizan^a, Rahmath Abdulla^a, Mohd Yunus Shukor^b, Siti Aqlima Ahmad^b, Mohd Rosni Sulaiman^c, Mohd Khalizan Sabullah^{a*}

^aFakulti Sains dan Sumber Alam, Universiti Malaysia Sabah, 88400 Kota Kinabalu, Sabah, Malaysia

^bJabatan Biokimia, Fakulti Bioteknologi dan Sains Biomolekul, University Putra Malaysia, 43400 Serdang, Selangor, Malaysia

^cFakulti Sains Makanan dan Pemakanan, Universiti Malaysia Sabah, 88400 Kota Kinabalu, Sabah, Malaysia

Article history

Received

26 October 2019

Received in revised form

30 May 2020

Accepted

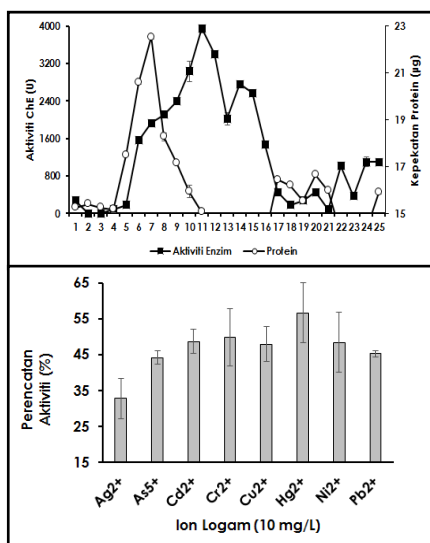
17 June 2020

Published online

27 August 2020

*Corresponding author
khalizan@ums.edu.my

Graphical abstract



Abstract

The presence of high concentrations of heavy metals in the river impedes daily activities and damages the surrounding aquatic ecosystem. Continuous monitoring should be implemented to prevent continuous discharge resulting in increased levels of pollution over time. This study aims to determine the sensitivity of *Monopterus albus* muscle ChE to metal ions. Priorly, ChE was purified from *M. albus* muscle tissue using the ion exchange matrix, DEAE, with the yield percentage of 42.16% with the purification fold of 2.17. PTC was selected as a specific synthetic substrate with the highest concentration and lowest biomolecular constant at $145838 \pm 7533 \mu\text{M}\cdot\text{min}\cdot\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ and 0.26 mM, while optimal assay parameters were obtained at pH 7.5 at 20 °C. Inhibition studies of metal ions involving Cr, Cd, Ag, As, Hg, Pb, Ni and Cu at the concentration of 10 mg/L. The activity of *M. albus* ChE was 56.61% inhibited by Hg²⁺ and the highest recorded compared to the other metals ion arranged in declining order; Cr < Cd = Ni < Cu < Pb < As < Ag. Overall, purified ChE from *M. albus* muscle has proven its ability to be applied as a biosensor that can be used for environmental monitoring programs.

Keywords: Pollution, metal ions, biosensor, cholinesterase, optimal assay

Abstrak

Kewujudan logam-logam berat yang berkepekatan tinggi dalam sungai merosakkan aktiviti harian serta merosakkan ekosistem akuatik sekelilingnya. Pemantauan yang

berterusan wajar diteruskan bagi menghalang pelepasan yang berterusan menyebabkan tahap pencemaran meningkat dari semasa ke semasa. Matlamat kajian ini adalah untuk menentukan kesensitifan ChE dari otot *Monopterus albus* ke atas ion-ion logam. ChE telah dituliskan dari tisu otot *M. albus* menggunakan matrik pertukaran ion, DEAE sefaros dengan peratusan hasil sebanyak 42.16% dengan jumlah gandaan penulenan sebanyak 2.17. PTC dipilih sebagai substrat sintetik spesifik dengan halaju maksimal tertinggi dan pemalar biomolekul masing-masing pada $145838 \pm 7533 \mu\text{M}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ dan 0.26 mM, sementara asai parameter optimum diperoleh pada pH 7.5 pada suhu 20°C . Kajian perencatan ion logam yang melibatkan Cr, Cd, Ag, As, Hg, Pb, Ni dan Cu berkepekatan 10 mg/L. Aktiviti *M. albus* ChE telah direncatkan sebanyak 56.61 % oleh Hg^{2+} dan tertinggi direkodkan berbanding ion logam yang lain disusun dalam turutan menurun; $\text{Cr}<\text{Cd}=\text{Ni}<\text{Cu}<\text{Pb}<\text{As}<\text{Ag}$. Tuntasnya, ChE yang telah dituliskan dari otot *M. albus* telah membuktikan kemampuannya untuk diaplikasikan sebagai biopenderia yang mampu digunakan untuk program pemantauan alam sekitar.

Kata kunci: Pencemaran, logam berat, biopenderia, kolinesteres, asai optimum

© 2020 Penerbit UTM Press. All rights reserved

1.0 PENGENALAN

Pencemaran sungai adalah fenomena yang tidak lagi biasa malah semakin meruncing dari hari ke hari. Tambahan, masalah ini menyumbang kepada kekurangan sumber air bersih dan berkemungkinan besar semakin sukar untuk dirawat dan disalurkan kepada penduduk setempat. Jabatan Alam Sekitar Malaysia [1] melaporkan bilangan sungai-sungai tercemar semakin meningkat, malah pada tahun 2016 mencatatkan sebanyak 253 sungai-sungai yang tercemar melebihi sungai-sungai yang bersih iaitu sekitar 224 sahaja. Hal ini demikian apabila pembangunan industri dari pelbagai sektor yang meningkat secara pesat dan memdadak menyumbang kepada pembuangan sisa secara sengaja atau tidak, mengalir terus ke sumber air yang berdekatan, sungai dan seterusnya lautan. Oleh kerana berterusan tidak terkawal, sumber air tersebut boleh dianggap tercemar kerana kewujudan bahan-bahan asing yang memberi impak kepada kemerosotan kualiti kebersihan dan keselamatan untuk kegunaan harian. Bahan-bahan asing seperti sisa-sisa organik dan tidak organik, xenobiotik dan logam berat mempengaruhi perkembangan mikroorganisma yang memerlukan banyak oksigen untuk proses penguraian, dan secara tidak sengaja mempengaruhi kemandirian ekosistem akuatik.

Logam berat secara semulajadinya wujud di alam sekitar dalam bentuk garam atau sebagai sebatian kompleks yang menjadikan sumber ion logam surih untuk digunakan oleh tumbuhan dalam memberikan mengawal atur sistem biologi. Selain itu, ion logam mampu berfungsi secara berganda seperti bertindak sebagai kofactor untuk memudahkan pembentukan kompleks enzim-substrat [2], mengawal atur tindak balas tekanan oksidatif [3] dan perkembangan embrio/janin [4]. Secara amnya, logam berat boleh dikategorikan sebagai toksik apabila kepekataannya berada pada

tahap yang sangat tinggi melebihi kepekatan asal yang hadir dalam sesuatu organisma terutama pada bahagian organ-organ penting seperti hati, otak dan ginjal [5]. Ion logam mempunyai kecenderungan yang tinggi memberi kesan negatif atau toksik ke atas beberapa aktiviti biologi melalui proses biopengumpulan sama ada termendak di organ dalaman atau interaksi pada bahan terlarut semasa proses peredaran darah. Antara contoh keupayaan untuk membentuk ikatan pada tapak aktif atau tapak allosterik enzim melalui interaksi asid amino berkumpulan -OH dan -SH lalu mengubah sifat asalnya, lalu merencat metabolisasi enzim.

Pelbagai kaedah diimplemintasikan bagi memelihara kebersihan sungai yang merupakan sumber air utama. Antaranya, kaedah fizikal yang melibatkan proses pemendapan, pengapungan, penjerapan diikuti penapisan dengan menggunakan rak bar, skrin, penapis bola manik penuh dan membran. Selain itu, rawatan kimia turut digunakan melibatkan proses-proses seperti pemendakan kimia, pembekuan kimia, pengoksidaan kimia dan pengoksidaan lanjutan. Berbeza dengan kaedah biologi di mana mikroorganisma yang berpotensi akan dieksploitasikan untuk mengdegradasikan bahan toksik atau mengubah sifat bahan tersebut menjadi tidak toksik, atau kurang berbahaya. Walau bagaimanapun, dari perspektif berbeza, kaedah-kaedah tersebut masih lagi mempunyai beberapa kekangan yang tidak dapat dielak. Tidak dinafikan kos operasi untuk kaedah rawatan tersebut adalah sangat tinggi di samping penggunaan kawasan rawatan yang lebih luas untuk dilaksanakan. Tambahan, kerisauan pembentukan metabolit sekunder yang kemungkinan bersifat toksik, serta proses remediasi memerlukan jangka masa yang panjang. Sememangnya kaedah rawatan tersebut menggunakan teknologi berprestasi tinggi serta pengendaliannya masih memerlukan tenaga kerja yang mahir dan berkepakaran tinggi [6].

Secara alternatif, beberapa penyelidik memperkenalkan kaedah yang lebih murah, pantas dan mudah dikendalikan iaitu pemantauan alam sekitar awalan menggunakan biopenderia berasaskan enzim sebelum pemantauan sekunder; kromatografi cecair prestasi tinggi, plasma berpasangan induktif, dan kromatografi gas, diperlukan. Shukor *et al.*, [7] membuktikan penggunaan asetilkolinesteres dari *Electrophorus electricus* untuk pemantauan masa nyata terus pada sungai untuk selang masa yang berlainan dan terbukti keberkesannya secara semi kuantitatif pada aktiviti enzim tersebut, dan disahkan secara kuantitatif menggunakan plasma berpasangan induktif. Sabullah *et al.*, [6] turut membuktikan keupayaan asetilkolinesteres dari otak ikan belacak, *Periophtholmodon schlorseri* dalam memantau kebersihan beberapa Sungai antaranya Sungai Juru; Pulau pinang, Sungai Melaka; Melaka, Sungai Kuyuh; Selangor, dan Air terjun Taman Negeri Johor. Berbeza dengan Baskaran *et al.*, [8] menggunakan enzim protease dari ketumbar, *Coriandrum sativum* L. serta membuktikan kesensitifan terhadap ketoksikan zink dan merkuri. Urease pegun juga mampu mengesan kehadiran ion logam seperti kadmium, kuprum dan plumbum [9].

Penggunaan kolinesteres, ChE dianggap sesuai oleh kerana jenis pengesan yang luas terutamanya kehadiran ion logam dalam sampel. Terdapat beberapa kolinesteres dari sumber ikan tempatan yang telah direkodkan potensinya sebagai biopenderia contohnya dari otak ikan patin; *Pangasius pangasius* [10], hati ikan siakap; *Lates calcarifer* [11] dan otak ikan puyu; *Anabas testudineus* [12]. Walau bagaimanapun, tiada rekod kolinesteres yang diekstrak dari tisu otot atau daging ikan untuk kegunaan pengesan biologi. Maka, dalam kajian ini daging ikan belut sawah, *Monopterus albus* dipilih untuk diekstrak lalu ditulenkan, seterusnya ditentukan keadaan assai optimum sebelum dinilai keupayaannya sebagai biopenderia alternatif melalui kajian perencatan terhadap ion logam yang terpilih.

2.0 METODOLOGI

2.1 Penyediaan Specimen

Specimen diperolehi dari pasar basah berdekatan, dibawa hidup-hidup ke makmal dan diaklimatisasi selama dua hari sebelum dikorban dengan cara ditanam di dalam kumpulan ais (Rajah 1). Hanya ikan belut yang bebas penyakit atau tiada luka luaran dipilih. 5 gram daging telah dihiris dan dihancurkan menggunakan lesung dan antan kemudian dicampur dengan penimbal natrium fosfat pH 7.5, 0.1 M pada nisbah 1:4 [berat/isipadu] diikuti penghomogenan menggunakan UltraTurax T25. Ekstrak diempar pada kelajuan 10,000 x g selama 10 minit pada suhu dingin, 4 °C. Supernatan

dikumpulkan untuk disimpan atau diteruskan untuk proses penulenan.



Rajah 1 *M. albus*: Panjang 72-75 cm, berat 330 – 350 g

2.2 Penulenan Enzim, Penentuan Aktiviti dan Protein

200 μ L supernatan telah dimuatkan ke dalam kolum yang mengandungi DEAE-Sephadex yang berdimensi 15 mm dan berketinggian 40 mm. Langkah pencucian dilaksanakan dengan memuatkan 5 mL penimbal natrium fosfat 25 mM, pH 7.5 diikuti proses pengelutan menggunakan penimbal yang sama tetapi mengandungi kepekatan natrium klorida yang berbeza-beza dimulai 5 mL kepekatan NaCl pada 0.2 M, seterusnya 0.4 M, 0.6 M, 0.8 M dan 1.0 M. Setiap titisan dari langakah pembersihan dan pengelutan dikumpul sebanyak 1 mL fraksi dengan kadar pengaliran dikawal antara 0.25 - 0.3 mL per minit. Setiap fraksi tersebut disimpan pada keadaan dingin sebelum ditentukan aktiviti ChE menggunakan kaedah Ellman *et al.* [13]. 200 μ L penampan natrium fosfat [0.1 M, pH 7.0], 20 μ L DTNB (0.1 mM), dan 10 μ L ChE dimasukkan ke dalam telaga mikroplat dan diinkubasi selama 15 minit. Kemudian, 20 μ L asetiltiokolin iodide; ATC [2.5 mM] ditambah pada campuran dan diinkubasi selama 10 minit. Aktiviti ChE dinyatakan sebagai jumlah substrat [μ M] dipecahkan oleh ChE per minit [U] dengan pekali pemupusan 13.6 $\text{mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ manakala aktiviti tertentu diberikan sebagai $\mu \text{ mole} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$. Protein atau U. mg^{-1} protein. Penentuan kandungan protein diukur menggunakan kaedah yang dibangunkan oleh Bradford, [14]. Bovin serum albumin digunakan sebagai piawai bagi penentuan kuantiti protein. Kesemua ujian telah dilakukan keadaan gelap serta peniga data direkodkan. Fraksi yang menunjukkan aktiviti enzim ChE yang tinggi akan dikumpulkan dan dinyahgaram melalui pengemparan menggunakan VivaSpin.

2.3 Penentuan Keadaan Assai Optimum

Tiga jenis parameter ditentukan iaitu spesifik substrat, pH dan suhu inkubasi. Penentuan spesifik substrat untuk *M. albus* ChE ditentukan dalam penampan natrium fosfat (0.1 M, pH 7.0), pada suhu bilik menggunakan substrat sintetik yang berbeza, iaitu ATC, butiltiokolin iodida; BTC, dan propioniltiokolin iodida; PTC, pada kepekatan antara 0.5 hingga 2.5 mM. Keluk Michaelis-Menten telah diplotkan untuk menentukan halaju aktiviti maksima (V_{max}) ChE dan pemalar biomolekul (K_m) menggunakan perisian GraphPad Prism versi 5. Suhu optimum ChE

ditentukan dengan menginkubkan campuran reaksi dalam suhu yang berbeza antara 15 hingga 50 ° C. Lebih dari suhu ujikaji ini, ChE dianggap telah ternyahasi. Untuk penentuan inkubasi pH yang sesuai untuk ChE diinkubasikan menggunakan sistem penampakan bertindih yang terdiri daripada penampakan 0.1 M asetat (pH 3 hingga 5.5), penampakan 0.1 M natrium fosfat (pH 5.5 hingga 8), dan penampakan 0.1 M tris-HCl (pH 7 hingga 10). Peniga data direkodkan untuk kesemua ujikaji ini.

2.4 Kesan Logam Berat

Kesan lapan ion logam, iaitu argentum; Ag^{2+} , arsenic; As^{5+} , cadmium; Cd^{2+} , kromium; Cr^{6+} , kuprum; Cu^{2+} , merkuri; Hg^{2+} , dan plumbum; Pb^{2+} ke atas *M. albus* ChE telah diuji. Logam-logam ini dipilih kerana keupayaannya menyebabkan kesan negatif kepada alam sekitar serta kebolehpayaan untuk bioakumulasi dalam system biologi. Campuran tindak balas mengandungi 150 μ L penampakan natrium fosfat [0.1 M, pH 7.5], 50 μ L ion logam dengan kepekatan akhir 5 mg/L, 20 μ L DTNB (0.1 mM), dan 10 μ L daripada sampel ChE. Campuran diinkubasi selama 15 minit sebelum 20 μ L substrat dimasukkan ke dalam campuran diikuti oleh 10 minit inkubasi. Penyerapan dibaca pada akhir masa inkubasi pada panjang gelombang 405 nm dan aktiviti ChE diterjemahkan dalam betuk peratusan perencatan.

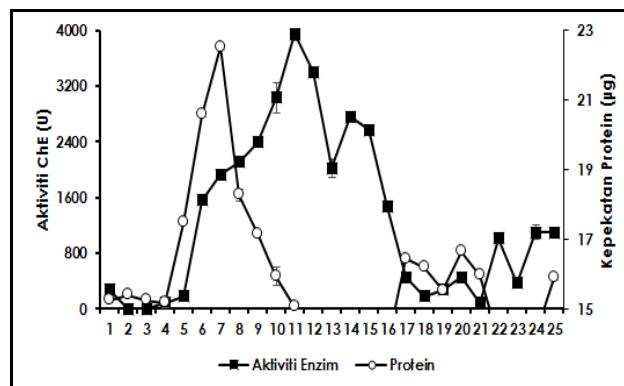
2.5 Analisis Statistik

Min \pm sisihan piawai (SE) dianalisis dengan menggunakan GraphPad Prism versi 5.0. Perbandingan antara dua atau lebih kumpulan diukur berdasarkan ujian t-test atau analisis varians satu arah (ANOVA) dengan analisis post hoc oleh ujian Tukey dan $P < 0.005$ dianggap signifikan secara statistik.

3.0 KEPUTUSAN DAN PERBINCANGAN

3.1 Profil Penulenan

Supernatan yang diperolehi daripada hati *M. albus* telah digunakan untuk proses penulenan menggunakan teknik kromatografi pertukaran ion dimana DEAE sefaros sebagai ligan pengikat. Berdasarkan kepada profil penulenan (Rajah 2), aktiviti ChE pada fraksi ke-6 hingga 16 menunjukkan ketinggian melebihi 1500 U. Walau bagaimanapun, bagi mengurangkan kontaminasi protein pada sampel ChE, fraksi ke-10 hingga 12 digunakan bagi meneruskan proses seterusnya memandangkan pengiraan aktiviti spesifik yang sangat tinggi berbanding fraksi yang lain (data tidak dimasukkan).



Rajah 2 Profil penulenan ChE dari hati ikan belut. Bar hitam mewakili sisihan piawai untuk min bagi peniga data

Berdasarkan kepada Jadual 1, ChE telah berjaya ditulenan sebanyak 4.86 kali dengan hasil enzim sebanyak 30.32% diikuti aktiviti spesifik yang meningkat kepada 272565.90 U mg^{-1} . Enzim yang terhasil sebanyak ini adalah perbandingan dengan hasil peratusan dari homogenat mentah. Aktiviti spesifik separa penulenan ditentukan dengan μ mol.min $^{-1}$.mg $^{-1}$ protein atau U.mg $^{-1}$ protein.

Table 1 Jadual Penulenan pada setiap peringkat penulenan diakhiri dengan sampel yang ditulenan menggunakan DEAE sefaros

Prosedur	Aktiviti Spesifik [U.mg $^{-1}$]*	Gandaan Penulenan	Peratusan Hasil [%]**
Homogenat mentah	25279.90	1	100
Supernatan	32440.13	1.28	72.85
DEAE Sefaros	54891.80	2.17	30.71

*Pengiraan berdasarkan kepada jumlah aktiviti ChE dibahagikan dengan jumlah protein

**Pengiraan peratusan perbandingan dengan jumlah aktiviti ChE.

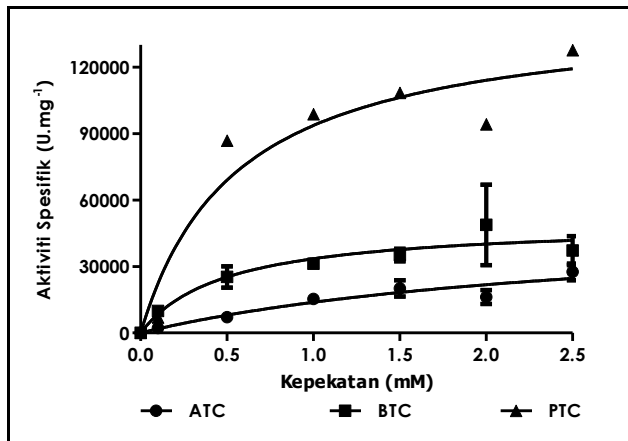
Secara teori, penulenan protein diperlukan dalam kajian yang berkaitan dengan penentuan fungsi biokimia, penentuan jisim molekular, pengecaman dan pengenalpastian struktur protein sasaran dan analisis individu bagi mendapatkan kajian yang jitu [15].

Dalam kajian ini, penulenan protein diperlukan untuk meningkatkan kadar kesensitifan ChE ke atas toksikan dengan menyingkirkan protein asing yang akan mengganggu tindak balas enzim [11]. Keputusan yang didapati menunjukkan sasaran enzim adalah ChE telah terpisah dari ligan dan dilusi keluar bersama-sama penimbal elusi. Seterusnya, jenis ChE ditentukan berdasarkan kepada keputusan dari kajian parameter spesifik substrat.

3.1 Parameter Enzim

3.1.1 Pemilihan Substrat Spesifik

Profil separa penulenan spesifik substart diperoleh dengan menggunakan tiga substrat yang berbeza iaitu ATC, BTC dan PTC dengan julat kepekatan yang digunakan adalah dari 0.1 mM hingga 2.5 mM. Berdasarkan kepada Rajah 3, separa penulenan enzim menunjukkan keafinan kepada substrat PTC secara kasarnya.



Rajah 3 Keluk aktiviti spesifik ChE untuk tiga jenis substrat berbeza; ATC, BTC dan PTC. Setiap nilai adalah purata \pm SD untuk tiga replikasi

Parameter kinetik ChE ke atas ATC, BTC dan PTC ditentukan dengan pengiraan V_{max} dan K_m . V_{max} adalah ukuran bagi menentukan kelajuan enzim dalam bertindak balas dimana Ketinggiannya mencerminkan ikatan enzim dan kecekapan enzim bertindak ke atas substrat. K_m yang rendah menunjukkan affiniti enzim yang tinggi ke atas substart. Jadual 2 menunjukkan hasil V_{max} dan K_m yang dijana dengan menggunakan perisian Graphic Prism.

Jadual 2 Perbandingan K_m dan V_{max} aktiviti ChE *M. albus* antara ATC, BTC dan PTC

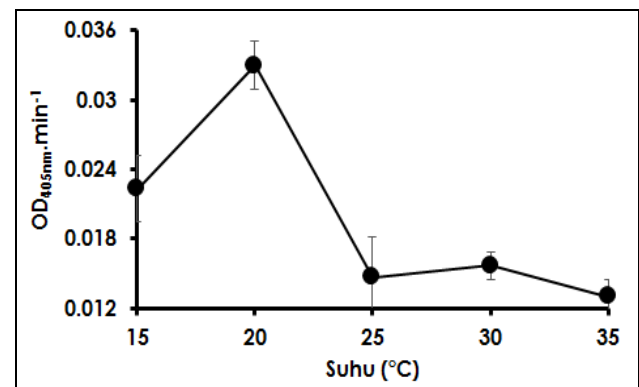
	Min \pm Sisihan Piawai		
	ATC	BTC	PTC
V_{max} [μ M/min/mg]	51155 \pm 1078	49999 \pm 250	145838 \pm 7533
K_m [mM]	2.10 \pm 0.73	0.35 \pm 0.02	0.26 \pm 0.01
Kecekapan katalitik [[V_{max}/K_m] $\times 10^3$]	24.36	142.85	560.92

Menurut Tecles dan Ceron, [16] enzim ChE mempunyai kebolehubahan untuk afiniti substrat sintetik. Oleh hal demikian, perbandingan kinetik antara substrat yang berbeza wajar dilaksanakan

bagi pemilihan yang bersesuaian dengan sampel ChE *M. albus*. Secara jelasnya, PTC menunjukkan nilai Kecekapan katalitik yang tertinggi diikuti oleh BTC dan ATC iaitu masing-masing pada 560.92×10^3 , 142.85×10^3 dan 24.36×10^3 $V_{max} \cdot K_m^{-1}$, dan ini menunjukkan PTC dipilih sebagai substrat dan terus digunakan untuk penentuan optimum pH dan suhu inkubasi. Selain itu, oleh kerana secara katalitiknya PTC lebih tinggi dari substrat sintetik yang lain, maka sampel yang dituliskan mengandungi banyak ChE jenis propionilkolinesteres; PChE, dan turut mengandungi sedikit butyrikolinesteres dan asetilkolinesteres memandangkan kaedah penulenan yang dijalankan hanyalah sekali dan perlu digandingkan dengan proses penulenan yang lain.

3.1.2 Profil Kesan Suhu ke atas Aktiviti ChE

Profil suhu untuk separa penulenan enzim ditentukan dengan inkubasi secara berasingan pada suhu yang berbeza bermula dari 15 °C hingga 35 °C (Rajah 4). Berdasarkan kepada Rajah 3, aktiviti enzim separa penulenan meningkat pada suhu 20 dan kemudian menyusut secara mendadak selepas suhu ini. Hal ini demikian kerana suhu yang tinggi mampu memberi kesan signifikan pada stuktur konformasi protein menyebabkan pembentukan kompleks enzim-substrat tidak akan berlaku. Malah, pada suhu yang lebih tinggi diikuti masa inkubasi yang terlalu lama menyebabkan ChE akan ternyahasli dan hilang fungsi asalnya. Namun begitu, suhu optimum adalah berbeza mengikut spesies ikan dan organ ikan yang diuji. Sebagai contohnya, enzim ChE yang terdapat pada tisu hati *P. javanicus* mencapai suhu yang optimum pada julat 25 – 35 °C [17], dan suhu optimum bagi enzim ChE yang disepara tulenkan dari tisu hati *A. testudineus* ialah pada 40 °C [11]. Suhu optimum bagi enzim ChE dari tisu buah pinggang *L. calcarifer* adalah 25 °C [18].

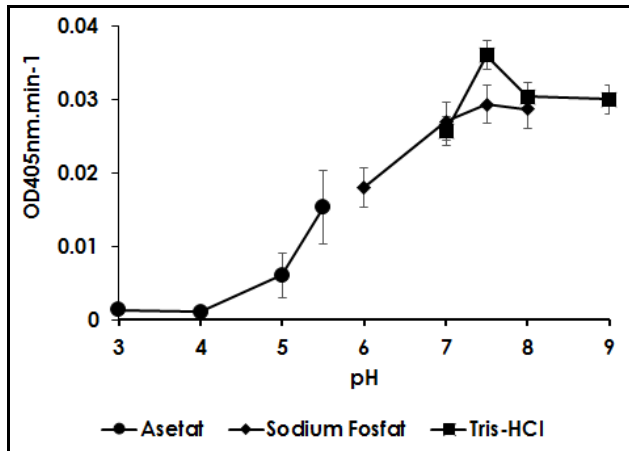


Rajah 4 Profil suhu ke atas aktiviti enzim ChE *M. albus*. Setiap nilai adalah purata \pm SD untuk tiga replikasi

3.1.3 Profil Kesan pH ke atas Aktiviti ChE

Aktiviti ChE memaparkan kesan yang pelbagai pada julat pH yang berbeza. Sistem penimbal sangat

penting bagi memastikan pH yang optimum bagi memaksimumkan kecekapan ChE untuk bertindak balas dengan substrat. Oleh kerana setiap penimbal mempunyai kapasiti pH yang berbeza, maka sistem penimbal bertindih digunakan. Rajah 5 menunjukkan aktiviti optimum ChE pada pH 7.5 untuk kedua-dua penimbal tris-HCl dan natrium fosfat. Walau bagaimanapun, penimbal 0.1 M tris-HCl pH 7.5 digunakan untuk ujian seterusnya.



Rajah 4 Profil pH ke atas aktiviti enzim ChE *M. albus*. Setiap nilai adalah purata \pm SD untuk tiga replikasi

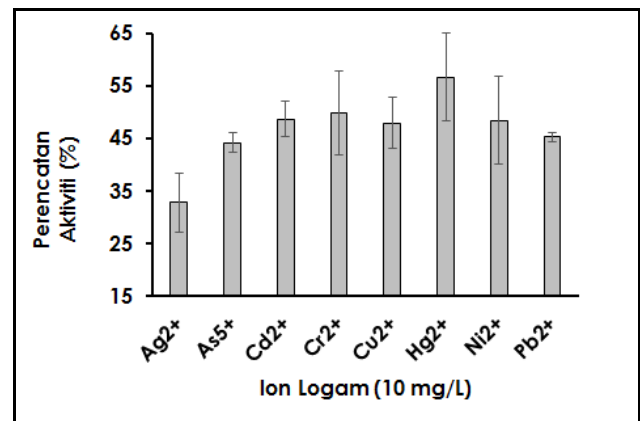
Pada pH yang rendah, ChE tidak efektif kerana kepekatan ion hidrogen mengganggu ikatan ionik ChE dan memberi kesan kepada perubahan bentuk enzim. Tambahan, asid amino berimidazola seperti histidin dan triptofan pada tapak enzim mengalami protonasi menyebabkan kehilangan sifat mangkin. Manakala pada pH yang tinggi, imidazola akan kehilangan proton kerana pembentukan ion imidazolot di samping kepekatan ion hidroksida memenuhi permukaan sama ada enzim dan substrat. Secara jelasnya pada kedua-dua keadaan tersebut mengagalkan pembentukan ikatan antara substrat dan ChE [17, 18].

3.1.4 Ujian Kesan Perencatan Ion Logam

Ujikaji kesan perencatan adalah sangat penting menilai kecekapan atau kepekaan ChE *M. albus* terhadap kehadiran ion logam. Terdapat lapan ion logam berat yang berbeza disediakan pada kepekatan 10 mg/L diuji ke atas aktiviti ChE (Rajah 5). Logam – logam berat ini dipilih kerana keperluannya yang sangat kerap dalam pelbagai industri seperti pembuatan komponen elektrik dan elektronik, automatif, kimpalan dan lain-lain, manakala di sektor pertanian ianya menjadi unsur surih untuk baja tanaman mahupun racun perosak. Tambahan, kewujudan ion logam ini di dalam sungai walaupun berkepekatan yang rendah, ianya mampu memberikan impak yang negatif kepada organisma yang terdedah di mana kesan buruknya berlaku dari peringkat biomolekular, selular hingga fisiologikal [6].

Maka, kepekatan 10 mg/L ion logam dipilih bagi penentuan kesensitifan ke atas aktiviti ChE *M. albus* serta potensi sebagai biopenderia seperti yang pernah dilakukan oleh Khalidi et al., [20].

Secara keseluruhan, hampir kesemua ion logam mampu memberi kesan kepada peratusan perencatan aktiviti PChE dalam lingkungan antara 32 hingga 55 peratus di mana Hg²⁺ direkodkan perencatan tertinggi sebanyak 56.61 % diikuti oleh Cr²⁺, Cd²⁺, Ni²⁺, Cu²⁺, Pb²⁺, As⁵⁺, dan Ag²⁺. Hg²⁺ menunjukkan kesan perencatan yang tinggi kerana keaffiniannya yang tinggi pada kumpulan sulfur yang terdapat pada ChE [19]. Keputusan ini bertepatan dengan kajian yang telah dilakukan oleh beberapa orang penyelidik bahawa raksa dan kuprum mempunyai kesan perencatan yang tinggi kepada aktiviti ChE ikan seperti *Pomatoschistus microps*, *Puntius javanicus*, *Anabas testudineus*, dan *Claris gariepinus* [1, 5, 21].



Rajah 5 *M. albus* diinkubasi secara berasingan dengan larutan – larutan ion logam yang berbeza berkepekatan 10 mg/L. Data diterjemahkan dalam bentuk peratusan aktiviti ChE yang telah terencat. Setiap nilai adalah purata \pm SD untuk tiga replikasi

Ion-ion logam turut mampu bertindak balas dengan kumpulan R asid amino. Antara contoh, Yamauchi et al., [22] memaklumkan interaksi ion logam pada asid amino bercas negatif mengandungi kumpulan karboksil seperti glutamat dan aspartat yang wujud pada triad pemangkin kolinesteres justeru mengubah struktur tapak aktifnya. Selain itu, kumpulan imidazole pada histidin membekalkan tarikan cation- π yang kuat untuk berinteraksi dengan kation bernitrogen pada substrat atau ion logam bebas. Walau bagaimanapun, untuk kajian ini, hanya kesan tunggal ion logam ke atas aktiviti *M. albus* ChE dijalankan. Jika dibandingkan dengan kajian yang dijalankan oleh Sabullah et al., [17] menunjukkan kombinasi berpasangan antara ion logam yang berbeza mampu memberi kesan sinergistik kepada aktiviti enzim. Secara logiknya, sisa-sisa industri yang mencemari sungai yang berdekatan mengandungi ion logam yang pelbagai. Ini dibuktikan melalui kajian yang

dijalankan oleh Baskaran et al., [8] ke atas sampel Kawasan Perindustrian Bukit Tengah, Pulau Pinang menunjukkan kewujudan beberapa ion logam yang berkepekatan tinggi seperti Zn^{2+} dan Hg^{2+} . Shukor et al., [7] turut merekodkan ketinggian kepekatan Cu, Ag dan Hg dalam sampel sungai berdekatan Kawasan Perindustrian Prai. Sabullah et al., [6] mengeksploitasikan asetilkolinesteres dari ikan belacak, *Periophthalmodon schlosseri* untuk memantau beberapa lokasi di sungai-sungai yang tercemar di Malaysia menunjukkan kemampuannya sebagai biopenderia.

Dibandingkan kajian ini, tidak banyak kajian menggunakan tisu otot ikan. Hayat et al., [11] sebagai contoh membandingkan dan menilai kemampuan insang ikan siakap, *Lates calcarifer* lebih sensitif kepada beberapa ion logam berbanding otot ikan tersebut. Berdasarkan kajian ini walaupun satu kaedah penulenan dijalankan tetapi kesensitifan terhadap kesemua ion logam berkepekatan 10 mg/L boleh diterima dan berpotensi untuk menjadi sumber untuk digembangkan sebagai bahan biopenderia untuk memantau kebersihan sungai-sungai di Malaysia serta diaplikasikan alternatif asas rujukan sejajar dengan kebergantung kepada standard di Malaysia yang telah diperkenalkan sebagai Index Kualiti Air bagi mengelakkan kualiti sungai-sungai di Malaysia.

4.0 KESIMPULAN

ChE yang diekstrak dari daging *M. albus* telah berjaya diseparatulenkan dengan menggunakan DEAE sefaras sebagai matriks melalui pertukaran ion. Kajian terhadap substrat spesifik menunjukkan bahawa PTC merupakan substrat sintetik yang sangat spesifik kepada ChE *M. albus* berdasarkan pembuktian nisbah kecekapan katalitik yang tinggi berbanding BTC dan ATC. Tambahan, keadaan asai yang paling optimum telah ditentukan pH dan suhu inkubasinya iaitu masing-masing pada pH 7.5 dan 20°C. Hasil gabungan parameter tersebut telah diuji terhadap setiap ion logam yang berbeza bekepekatan 10 mg/L dan keputusannya positif dimana kesemuanya mampu merencat aktiviti enzim pada peratusan yang berbeza menunjukkan perbezaan dari segi kesensitifannya. ChE *M. albus* telah membuktikan kesensitifannya dan untuk menentukan kecekapan penuh ChE sebagai biopenderia, kajian lanjutan hendaklah dilaksanakan dengan proses penulenan penuh serta menguji lain-lain xenobiotik yang bersifat toksik.

Acknowledgement

Kajian ini di bawah tajaan SGPUMS 0132 – 2017 dan separa tajaan oleh UMSGreat; GUG0293/2018 203/PAERO/6730118. Sekalung penghargaan kepada Universiti Malaysia Sabah yang meluluskan

pembelajaan yang menjadikan penyelidikan penting ini berdaya maju dan berkesan.

References

- [1] Jabatan Alam Sekitar Malaysia. Kualiti Air Sungai. Bab 2. Pengawasan Kualiti Air Sungai. <http://www.doe.gov.my/portalv1/wp-content/uploads/2018/09/iv-EQR2016.pdf>.
- [2] Basirun, A. A., Ahmad, S. A., Yasid, N. A., Sabullah, M. K., Daud, H. M., Sha'arani, S., Khalid, A. and Shukor, M. Y. 2018. Toxicological Effects and Behavioural and Biochemical Responses of *Oreochromis Mossambicus* Gills and Its Cholinesterase to Copper: A Biomarker Application. *International Journal of Environmental Science and Technology*. 16(2): 887-898. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s13762-018-1711-1>.
- [3] Otto, C. C., Koehl, J. L., Solanky, D., and Haydel, S. E. 2014. Metal Ions, Not Metal-Catalyzed Oxidative Stress, Cause Clay Leachate Antibacterial Activity. *PLOS ONE*. 9: e115172. DOI: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0115172>.
- [4] Espart, A., Artime, S., Tort-Nasarre, G., and Yara-Varón, E. 2018. Cadmium Exposure During Pregnancy and Lactation: Materno-fetal and Newborn Repercussions of Cd(II), and Cd–metallothionein Complexes. *Metallomics*. 10(10): 1359-1367. DOI: <http://dx.doi.org/10.1039/C8MT00174J>.
- [5] Sabullah, M. K., Ahmad, S. A., Shukor, M. Y., Gansau, A. J., Syed, M. A., Sulaiman, M. R. and Shamaan, N. A. 2015. Heavy Metal Biomarker: Fish Behavior, Cellular Alteration, Enzymatic Reaction and Proteomics Approaches. *International Food Research Journal*. 22(2): 435-454.
- [6] Sabullah, M. K., Sulaiman, M. R., Shukor, M. S., Yusof, M. T., Johari, W. L. W., Shukor, M. Y. and Syahir, A. 2015. Heavy Metals Biomonitoring via Inhibitive Assay of Acetylcholinesterase from *Periophthalmodon schlosseri*. *Rendiconti Lincei*. 26(2): 151-158. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s12210-014-0359-0>.
- [7] Shukor, M. Y., Tham, L. G., Halmi, M. I. E., Khalid, I., Begum, G., Shukor, M. Y. and Syahir, A. 2013. Development of an Inhibitive Assay Using Commercial *Electrophorus Electricus* Acetylcholinesterase for Heavy Metal Detection. *Journal of Environmental Biology*. 34(5): 967-970.
- [8] Baskaran, G., Masdor, N. A., Syed, M. A., and Shukor, M. Y. 2013. An Inhibitive Enzyme Assay to Detect Mercury and Zinc Using Protease from *Coriandrum sativum*. *The Scientific World Journal*. 2013: 678356. DOI: <http://dx.doi.org/10.1155/2013/678356>.
- [9] Ilangovan, R., Daniel, D., Krastanov, A., Zachariah, C., and Elizabeth, R. 2006. Enzyme based Biosensor for Heavy Metal Ions Determination. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*. 20(1): 184-189. DOI: <http://dx.doi.org/10.1080/13102818.2006.10817330>.
- [10] Aidil, M. S., Sabullah, M. K., Halmi, M. I., Sulaiman, R., Shukor, M. S., Shukor, M. Y., Shaharuddin, N. A., Syed, M. A. and Amir Hamzah, A. S. 2013. Assay for Heavy Metals Using an Inhibitive Assay based on the Acetylcholinesterase from *Pangasius hypophthalmus* [Sauvage, 1878]. *Fresenius Environmental Bulletin*. 22(12): 3572-3576.
- [11] Hayat, N. M., Shamaan, N. A., Sabullah, M. K., Shukor, M. Y., Syed, M. A., Khalid, A., Dahalan, F. A. and Ahmad, S. A. 2016. The Use of *Lates calcarifer* as a Biomarker for Heavy Metals Detection. *Rendiconti Lincei*. 27(3): 463-472. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s12210-015-0501-7>.
- [12] Ahmad, S. A., Wong, Y. F., Shukor, M. Y., Sabullah, M. K., Yasid, N. A., Hayat, N. M., Shamaan, N. A., Khalid, A. and Syed, M. A. 2016. An alternative Bioassay using *Anabas testudineus* [Climbing perch] Cholinesterase for Metal Ions Detection. *International Food Research Journal*. 23(4): 1446-1452.

- [13] Ellman, G. L., Courtney, K. D., Andres, V., and Featherstone, R. M. 1961. A New and Rapid Colorimetric Determination of Acetylcholinesterase Activity. *Biochemical Pharmacology*. 7(2): 88-95. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/0006-2952\(61\)90145-9](http://dx.doi.org/10.1016/0006-2952(61)90145-9).
- [14] Bradford, M. M. 1976 A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-dye Binding. *Analytical Biochemistry*. 72(1-2): 248-254. DOI: <http://dx.doi.org/10.1006/abio.1976.9999>.
- [15] Berg, J. M., Tymoczko, J. L., and Stryer, L. 2002. The Purification of Proteins Is an Essential First Step in Understanding Their Function. *Biochemistry*. 5th edition.
- [16] Tecles, F., and Cerón, J. J. 2001. Determination of Whole Blood Cholinesterase in Different Animal Species Using Specific Substrates. *Research in Veterinary Science*. 70: 233-238. DOI: <http://dx.doi.org/10.1053/rvsc.2001.0465>.
- [17] Sabullah, M. K., Sulaiman, M. R., Shukor, M. Y. A., Syed, M. A., Shamaan, N. A., Khalid, A. and Ahmad, S. A. 2014. The Assessment of Cholinesterase from the Liver of *Puntius javanicus* as Detection of Metal Ions. *The Scientific World Journal*. 2014: ID571094. DOI: <http://dx.doi.org/10.1155/2014/571094>.
- [18] Hayat, N. M., Ahmad, S. A., Shamaan, N. A., Sabullah, M. K., Shukor, M. Y., Syed, M. A., Khalid, A., Khalil, K. A. and Dahalan, F. A. 2017. Characterisation of Cholinesterase from Kidney Tissue of Asian Seabass [*Lates calcarifer*] and Its Inhibition in Presence of Metal Ions. *Journal of Environmental Biology*. 38(3): 383-388. DOI: <http://dx.doi.org/10.22438/jeb/38/3/MRN-987>.
- [19] Li, S., and Hong, M. 2011. Protonation, Tautomerization, and Rotameric Structure of Histidine: A Comprehensive Study by Magic-angle-spinning Solid-state NMR. *Journal of the American Chemical Society*. 133: 1534-1544. DOI: <http://dx.doi.org/10.1021/ja108943n>.
- [20] Khalidi, S. A. M., Sabullah, M. K., Sani, S. A., Ahmad, S. A., Shukor, M. Y., Jaafar, I. N. M. and Gunasekaran, B. 2019. Acetylcholinesterase from the Brain of *Monopterus Albus* as Detection of Metal Ions. *Journal of Physics: Conference Series*. 1358: 012028.
- [21] Vieira, L. R., Gravato, C., Soares, A. M. V. M., Morgado, F., and Guilhermino, L. 2009. Acute Effects of Copper and Mercury on the Estuarine Fish *Pomatoschistus Microps*: Linking Biomarkers to Behaviour. *Chemosphere*. 76: 1416-1427. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2009.06.005>.
- [22] Yamauchi, O., Odanib, A. and Takanic, M. 2002. Metal-amino Acid Chemistry. Weak Interactions and Related Functions of Side Chain Groups. *Journal of the Chemical Society, Dalton Transactions*. 24: 4527-4754. <https://doi.org/10.1039/B202385G>.