

A SYSTEMATIC REVIEW OF THE APPLICATION OF ENZYME INHIBITION-BASED BIOSENSORS AS A PRELIMINARY SCREENING METHOD FOR ENVIRONMENTAL MONITORING AND FOOD SAFETY

ULASAN SISTEMATIK KEATAS PENGAPLIKASIAN BIOPENDERIA BERASASKAN PERENCATAN ENZIM SEBAGAI KAEDAH SARINGAN AWAL UNTUK PEMANTAUAN ALAM SEKITAR DAN KESELAMATAN MAKANAN

Article history

Received
14 June 2023
Received in revised form
1 August 2023
Accepted
6 August 2023
Published Online
20 April 2023

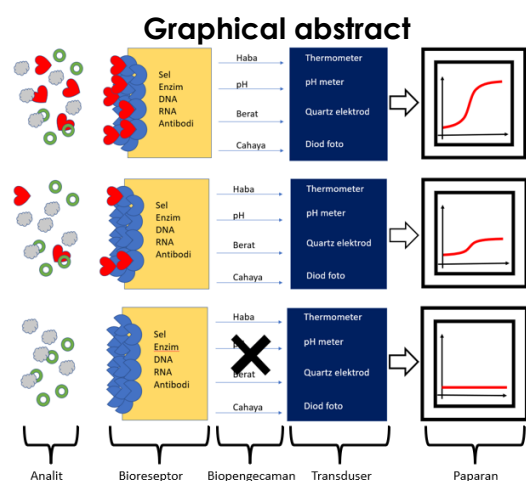
*Corresponding author
syedumarfaruq@ums.edu.my

Mohd Khalizan Sabullah^{a*}, Rahmath Abdullah^a, Roslina Jawan^a, Lucky Goh Poh Wah^a, Hartinie Marbawi^a, Syed Umar Faruq Syed Najmuddin^a, Jualang Azlan Gansau^a, Mohd Yunus Syukor^b, Mohd Nazri Abdul Rahman^c

^aBioAgriTech Group (BioATR), Fakulti Sains dan Sumber Alam, Universiti Malaysia Sabah, Jalan UMS, 88400 Kota Kinabalu, Sabah, Malaysia

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

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



Abstract

In this article, the latest discoveries in the development of biosensors based on enzyme inhibition are reviewed. Due to their excellent selectivity and sensitivity, they represent a significant alternative method to conventional analytical methods; which is a method of analysis that only relies on the generation of instrumentation data without any preliminary screening. Basically, biosensors are able to convert biological activity into a quantifiable signal. These enzyme inhibition-based biosensors have a wide range of applications in the fields of environmental safety, food safety, and clinical analysis since toxic substances containing heavy metals and pesticides are the most effective inhibitors of enzymes. This paper is aimed at exploring the methods used and the sensitivity to various inhibitors for biosensors based on the inhibition of enzymes such as glucose oxidase, urease, tyrosinase, cholinesterase, and other enzymes.

Keywords: Biosensor, reversible inhibitor, irreversible inhibitor, enzyme, lineweaverburk plot

Abstrak

Dalam artikel ini, penemuan terkini dalam pembangunan biopenderia berdasarkan perencatan enzim diulas. Oleh kerana kepilihan dan kepekaan yang sangat baik, ia mewakili kaedah alternatif penting kepada kaedah analisis konvensional; iaitu kaedah menganalisis yang hanya bergantung pada penjana data instrumentasi tanpa sebarang saringan awalan. Secara amnya biopenderia berkemampuan dalam menukar aktiviti biologi kepada isyarat yang boleh diukur. Biopenderia berasaskan perencatan enzim ini mempunyai pelbagai aplikasi dalam bidang keselamatan alam sekitar, keselamatan makanan, dan analisis klinikal kerana bahan – bahan toksik yang mengandungi logam berat dan racun perosak adalah perencat enzim yang paling berkesan. Kertas kerja ini bertujuan untuk meneroka kaedah yang digunakan dan kepekaan terhadap pelbagai perencat untuk biosensor berdasarkan perencatan enzim seperti glukosa oksidase, urease, tyrosinase, kolinesterase, dan enzim lain.

Kata kunci: Biopenderia, perencat berbalik, perencat tidak berbalik, enzim, plot lineweaver burk

© 2023 Penerbit UTM Press. All rights reserved

1.0 PENGENALAN

1.1 Pengaplikasian Biopenderia

Kaedah pemantauan menggunakan biopenderia menjadi pilihan dalam pelbagai bidang seperti pertanian, perubatan, industri makanan, sumber air, dan lain-lain dimana selain fungsinya yang mampu menjana data dengan cepat, kestabilan dan kesensitifannya turut dipercayai setanding dengan kaedah tradisi. Tambahan, trend penggunaan biopenderia berasaskan perencatan enzim semakin meningkat kerana kelebihan sebagai alat analisis yang mempunyai aktiviti pemangkin, yang menguatkan isyarat dan meningkatkan sensitiviti biopenderia disamping kepilihan yang tinggi terhadap substrat dimana mampu meminimumkan gangguan daripada sebatian lain dalam sampel [1]. Seajar dengan ciri – ciri tersebut menjadikan biopenderia ini berjaya digunakan dalam pelbagai aplikasi, termasuk pemantauan alam sekitar dan keselamatan makanan [2, 3].

Pemantauan alam sekitar dan keselamatan makanan adalah saing berkait rapat antara satu sama lain. Hal ini demikian kerana dengan memantau alam sekitar dan mengesan sumber pencemaran yang berpotensi, pengeluar makanan boleh mencegah pencemaran silang produk makanan, penyakit bawaan makanan dan memastikan keselamatan pengguna. Pemantauan alam sekitar selalunya diperlukan oleh panduan industri, program pensijilan dan perundangan. Pematuhan terhadap peraturan ini adalah penting untuk memastikan keselamatan dan kualiti produk makanan terjamin.

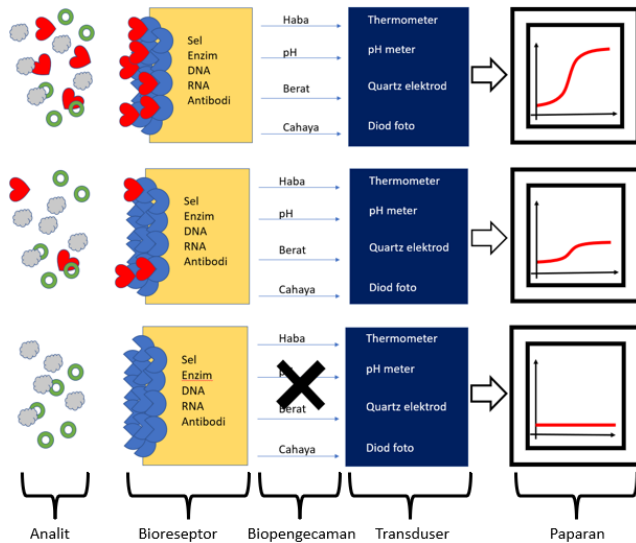
1.2 Prinsip Biosensor Berasaskan Enzim

Biopenderia ialah peranti yang berpotensi untuk mengesan kehadiran bahan atau analit tertentu

dalam sesuatu medium dengan kekhususan dan kesensitifan yang tinggi. Kebanyakan biosensor mampu mengukur kepekatan analit dalam larutan akueus, secara amnya menghasilkan isyarat yang dianggap berkadar dengan kepekatan analit dalam julat pengukurannya. Biopenderia pertama yang pernah diterbitkan pada tahun 1962 telah dibangun oleh Clark dan Lyons menggunakan glukosa oksidase pegun pada amperometrik elektrod oksigen [4]. Sejak itu, pelbagai penderia berasaskan enzim telah dibangun dan kini digunakan dalam beberapa bidang, seperti kawalan kualiti dan proses, bioreactor, pemantauan kebersihan alam sekitar, kebersihan sumber air dan makanan, pertanian, diagnostik, perubatan, pengeluaran ubat, ketenteraan, dan lain-lain. Tindak balas biosensor dicapai dengan sama ada mengukur melalui penggunaan substrat bersama atau jumlah produk yang terhasil. Situasi ini dipanggil Pemantauan langsung analit seperti yang dilaporkan dalam penentuan urea [5], kolesterol [6], dan glukosa [7].

Terdapat tiga komponen penting dalam penciptaan biopenderia iaitu 1) unsur biopengecaman yang terhasil daripada tindakbalas antara analit dan bioreseptor yang terdiri daripada biomolekul seperti asid nukleik, gula, enzim, antibodi, dan lain-lain, 2) transduser fiziko-kimia yang menukar tindak balas tenaga, daya atau gelombang kepada isyarat lain, dimana untuk kes ini kemampuan menukar tindak balas biologi kepada isyarat boleh diukur seperti pH, arus, haba, warna dan lain-lain), dan 3) fungsi pengesan yang mengenal pasti isyarat tersebut. Pembentangan skematik biopenderia enzim ditunjukkan dalam Rajah 1. Walaupun biopenderia mempunyai kelebihan sebagai konfigurasi yang ringkas, murah, mudah alih dan dikendalikan serta mampu beroperasi secara berterusan, kaedah ini mempunyai beberapa batasan, apabila digunakan pada pemantauan alam sekitar [8]. Kelemahan

utama terdiri daripada kepekatan dan kepelbagaian pencemar alam sekitar yang boleh berindak sebagai substrat untuk enzim dan mengehadakan pengesanan yang tinggi serta kesensitifan yang rendah.



Rajah 1 Pengoperasian biosensor. Transduser menjejak isyarat biopengecam hasil interaksi bioreseptor dan analit untuk menyampaikan output yang boleh dibaca. Papan menunjukkan isyarat yang terhasil berkadar terus dengan jumlah kehadiran analit yang disasarkan

Sebagai Langkah alternatif, pemantauan tidak langsung merujuk kepada penilaian bahan atau perencat yang secara khusus untuk berinteraksi dengan enzim dan menghalang sifat biokatalitiknya. Perencat tersebut berinteraksi secara spesifik kepada enzim lalu membantu kompleks enzim-perencat dan seterusnya mengganggu tindak balas enzim. Aspek berfaedah pemantauan tidak langsung ialah kebanyakan enzim mudah terdedah kepada kepekatan perencat yang sangat rendah, sekaligus meningkatkan sensitiviti biopenderia [9].

Biopenderia enzimatik terdiri daripada enzim, yang mengecam dan kemudian bertindak balas dengan analit sasaran menghasilkan isyarat kimia, seterusnya transduser mengubah kepada isyarat fizikal daripada kimia itu, dan penguat elektronik, yang mengkondisikan dan kemudian menguatkan isyarat tersebut. Enzim ialah unsur biopengecam yang paling kerap digunakan, manakala biopenderia yang paling banyak digunakan adalah berdasarkan transduksi elektrokimia. Kebiasannya, dua pendekatan berbeza boleh digunakan dalam pengukuran analit melalui biosensor enzimatik: (i) analit sasaran ialah substrat untuk enzim dan hasil tindak balas enzim diukur; (ii) analit sasaran bertindak sebagai perencat enzim dan penurunan pembentukan produk enzim diukur dan dikaitkan dengan kepekatan analit sasaran. Walaubagaimanapun, proses perencatan boleh berlaku sama ada berbalik, iaitu pengikatan perencat boleh diterbalikkan dengan mengurangkan kepekatan perencat, atau tidak dapat dipulihkan, di

mana pengikatan perencat adalah kekal justeru mengakibatkan perencatan berterusan aktiviti enzim [7].

Pengaplikasian biopenderia berdasarkan prinsip perencatan enzim kini telah digunakan untuk pelbagai jenis analit penting seperti racun perosak karbamat (CB), organofosforus (OP), organoklorin, logam berat dan ubatan [5,8-10]. Pemilihan sistem enzim/analit adalah berdasarkan fakta bahawa analit toksik ini menghalang fungsi enzim normal. Secara amnya, pembangunan sistem biopenderiaan ini bergantung pada pengukuran kuantitatif aktiviti enzim sebelum dan selepas pendedahan kepada analit sasaran. Biasanya peratusan perencatan enzim yang berlaku berkaitan dengan kepekatan perencat (iaitu analit) dan juga masa pendedahan. Akibatnya, aktiviti enzim akan berkadar songsang dengan peningkatan kepekatan perencat, atau masa inkubasi. Pengiraan yang biasa dilakukan adalah berdasarkan formula dibawah:

$$I \% = \left(\frac{E_0 - E_t}{E_0} \right) \times 100$$

Dimana E_0 = aktiviti enzim tanpa perencat; E_t = aktiviti enzim dengan perencat, and $I \%$ = peratusan aktiviti yang direncatkan oleh bahan toksik/perencat.

Walaubagaimanapun, formula diatas hanya diutamakan untuk perencatan tidak boleh balik, di mana perencat menyahaktifkan enzim secara kekal. Sebaliknya, dalam perencatan boleh balik, enzim yang diduduki boleh kembali ke keadaan aktif selepas perencat berpisah daripada enzim. Ini menunjukkan formula tersebut tidak boleh digunakan secara langsung melainkan penggunaan model kinetik untuk menerangkan kesan perencatan boleh balik pada aktiviti enzim. Model ini selalunya melibatkan pemalar kadar untuk pengikatan dan pemisahan perencat untuk menerangkan secara kuantitatif hubungan antara aktiviti enzim dan kepekatan perencat.

2.0 KATEGORI PERENCATAN ENZIM

2.1 Perencatan Tidak Berbalik

Perencatan tidak berbalik ialah proses di mana perencat membentuk ikatan pada tapak aktif enzim sama ada secara bukan kovalen atau kovalen seterusnya menghalang proses metabolisasi substrat. Kebiasannya, perencatan tidak berbalik perencat mengambil masa yang sangat lama untuk berpisah daripada enzim, atau boleh dikatakan perencatannya adalah kekal. Istilah tidak berbalik turut dimaksudkan dengan penguraian kompleks perencat enzim mengakibatkan pemusnahan enzim, cth. hidrolisis, pengoksidaan, dll [14]. Siddiqui *et al.* [15] telah menyebut perencat jenis tidak berbalik adalah proses penyahaktifan yang bergantung kepada masa. Ini dibuktikan oleh Han *et al.* [16] yang telah menyiasat keatas peroksidase oleh merkuri dimana

lima saat pertama adalah fasa perencatan berbalik, dan inkubasi melebihi dari tempoh itu merupakan tidak berbalik.

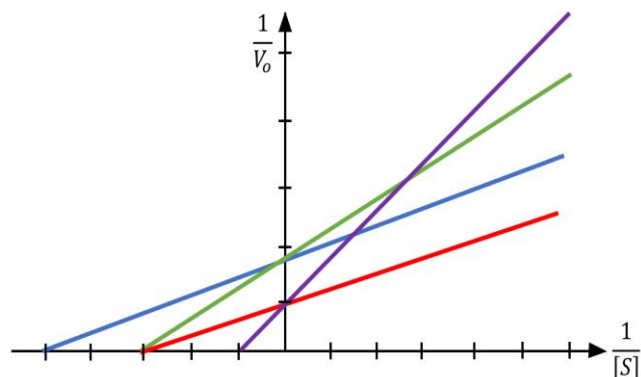
Walau bagaimanapun, oleh kerana perencatan boleh balik berlangsung selama beberapa saat sahaja, adalah sukar untuk menjalankan pengukuran aktiviti baki dalam selang itu. Oleh itu, perencatan tidak dapat dipulihkan perlu ditangani dalam kes di mana masa inkubasi yang lebih lama mesti digunakan. Sebagai langkah penyelesaian, pengukuran dijalankan apabila berlakunya model fenomena resapan yang meramalkan bahawa tahap peratusan perencatan enzim berdasarkan peratusan enzim tanpa perencat, sebelum atau selepas pendedahan kepada perencat, serta perkaitan secara linear dengan kedua-dua kepekatan perencat [I] bersama masa separa hayat ($t^{1/2}$) pengeraman [17, 18].

2.2 Perencatan Berbalik

Perencat hadir dari pelbagai sumber sama ada racun, dan baja dari aktiviti agrikultur, pelepasan sisa industri berat dan pembakaran bahan bakar fosil yang mengandungi logam berat yang tinggi, Perencatan berbalik ialah proses interaksi antara perencat dan enzim membentuk ikatan secara bukan kovalen dan mampu berpisah daripada enzim dengan sangat mudah. Walau bagaimanapun, tindak balas enzim mungkin berbeza-beza dengan setiap ujian kerana beberapa aktiviti enzim hilang selepas setiap langkah perencatan-penjanaan semula. Biopenderia berasaskan perencatan enzim boleh berbalik yang terkini dibangunkan telah dilaporkan seperti penentuan logam berat [16-18], pengawet makanan seperti asid koji, asid benzoik dan natrium azida [22], agen saraf seperti karbamat dan organofosfat [8, 23], ubat-ubatan seperti relenza dan moklobemida [24, 25], sebatian fenol [26].

Berdasarkan mekanisme untuk menghalang aktiviti enzim, atau pembentukan kompleks enzim-substrat, beberapa perencat boleh diklasifikasikan lagi kepada tiga jenis iaitu perencat bersaing, perencat tak bersaing, dan perencat tak bersaing. Untuk tindak balas bermangkin enzim, kesan perencatan yang berbeza pada garis kadar kepekatan berbanding substrat ditunjukkan dalam bentuk plot Lineweaver-Burk pada Rajah 2. Plot begini menyediakan kaedah grafik yang sangat berguna untuk menganalisis persamaan Michaelis-Menten, kerana sukar untuk menentukan halaju maksimum; V_{max} , dan pemalar biomolekul; K_m , dengan tepat ke atas tindak balas yang dimungkinkan enzim. V_{max} ialah kadar tindak balas maksimum atau halaju tindak balas yang dimungkinkan secara enzimatik apabila enzim tepu dengan substratnya. K_m ialah kepekatan substrat di mana halaju tindak balas adalah 50% daripada V_{max} . Enzim dengan nilai K_m yang rendah mempunyai keafinitian tinggi untuk substratnya, dimana hanya memerlukan kepekatan substrat yang sedikit untuk mencapai V_{max} , dan betigulah sebaliknya. Hayat et al. [27] mengaplikasikan penggunaan nisbah V_{max} dan

K_m bagi menentukan beberapa substrat sintetik yang paling efektif keatas ekstrak enzim kolinesterase dari *Lates calcarifer*.



Rajah 2 Plot Lineweaver Burk untuk analisis kinetik perencatan enzim. Garisan merah mewakili aktiviti enzim tanpa perencat. Garisan ungu, hijau dan biru masing – masing adalah enzim yang direncatkan secara bersaing, tidak bersaing, dan tidak bersaing. V_0 adalah halaju awal manakala $[S]$ adalah kepekatan substrat

Plot saling berganda ini dikenali sebagai plot Lineweaver-Burk dan sering dijumpai dalam literatur tentang pengiraan kinetik enzim dan substrat menghasilkan produk yang dikesan menggunakan kromogen tertentu. Sementara tiub yang mengandungi campuran substrat dan perencat hanya menghasilkan warna biru cair, manakala kehadiran perencat yang lebih tinggi menyebabkan tiada warna terhasil menunjukkan enzim telah direncat sepenuhnya.

3.1 Perencatan Protease

Protease ialah enzim yang memungkinkan proteolisis, memecahkan protein kepada polipeptida yang lebih kecil atau asid amino tunggal, dan merangsang pembentukan produk protein baru. Shukor et al. [28] antara yang terawal memperkenalkan pengaplikasian protease iaitu papain; E.C. 3.4.22.2, sebagai biopenderia ke atas logam berat. Secara asasnya, ujian protein dilakukan menggunakan kasein sebagai substrat, serta bergantung kepada keupayaan reagen pengikat pewarna Bradford untuk mewarnai polipeptida dengan berat molekul kurang daripada 2 kDa.

Kasein adalah protein besar dengan saiz molekul yang berbeza-beza dari monomer hingga ke beberapa bentuk polimer [26]. Casein diwarnai oleh reagen pengikat pewarna Bradford yang memberikan warna biru. Walaubagaimanapun, hasil degradasinya tidak diwarnai oleh reagen malah larutan kekal berwarna coklat. Dengan kehadiran logam berat yang menghalang aktiviti protease, kasein tidak dapat dicerna dan warna selepas pengeraman akan kekal biru. Di sinilah terletaknya kelebihan menggunakan sistem protease-kasein pengikat pewarna Bradford sebagai ujian untuk logam berat.

Papain terdiri daripada 212 protein rantai asid amino tunggal yang mengandungi tujuh residu sistein

dengan enam daripada residu membentuk tiga ikatan disulfida manakala baki sistein-25 menyediakan tapak aktif untuk kumpulan tiol [29, 30]. Logam berat seperti argentum dan merkuri telah menunjukkan kemampuan untuk mengikat kumpulan sulfhidril [31, 32]. Lai et al. [31] telah mengkaji untuk meningkatkan kesensitifan ke atas merkuri dengan menggabungkan penggunaan papain bersama 2,6-pyridinedicarboxylic acid yang merupakan ligand pengkelatan. Bromelin juga mempunyai kesensitifan ke atas merkuri dan kuprum, dan pengecualian agen pelindung sulfhidril dan etilenadiaminetetraasetik dalam ujian asal meningkatkan sensitiviti kepada logam berat ke beberapa kali ganda [32]. Baskaran et al. [33] menggunakan protease mentah daripada *Coriandrum sativum* dimana menunjukkan potensi yang baik untuk pembangunan ujian inhibitif yang cepat, sensitif dan ekonomi untuk biopemantauan Hg²⁺ dan Zn²⁺ dalam persekitaran akuatik. Uba et al. [36] memanfaatkan penggunaan metodologi permukaan tindak balas; RSM, reka bentuk komposit pusat; CCD, berjaya mengoptimalkan ujian pengikat pewarna protease ficin untuk merkuri, perak dan tembaga, menghasilkan penentuan yang lebih sensitif bagi ion merkuri, argentum dan kuprum dimana had pengesanan dan IC₅₀ yang terhasil adalah lebih baik daripada nilai yang diperolehi dengan pendekatan kaedah satu faktor pada satu masa; OFAT. Penggunaan protease sebagai biopenderia mempunyai kelebihan sebagai enzim yang paling tahan lasak dengan julat pH yang luas, kestabilan suhu tinggi dan kebal terhadap detergen dan penyahaktifan pelarut [37].

3.2 Perencatan Kolinesteres

Kolinesteres merupakan hidrolase serine yang tergolong diantara keluarga esterase/lipase dalam superfamili a/b-hydrolase, dimana fungsi utamanya memungkinkan hidrolisis ester berasaskan kolin, iaitu beberapa daripadanya berfungsi sebagai neurotransmitter [38, 39]. Kajian keatas enzim ini sangat berperanan dalam beberapa bidang penting, seperti neurobiologi, farmakologi dan toksikologi. Kebiasaan vertebrata dan invertebra, terdapat tiga enzim, yang biasanya ditakrifkan sebagai kolinesterases: asetilkolinesterase; AChE, butirilkolinesterase; BChE, dan propionilkolinesterase; PChE. BChE dan PChE juga dikenali sebagai pseudokolinesterase [40]. AChE memainkan peranan penting dalam sinaps otak kolinergik dan persimpangan neuromuskular. Ia mengambil bahagian dalam penamatan impuls kolinergik melalui hidrolisis neurotransmitter kolinergik asetilkolin (ACh). AChE didapati dalam tisu pengalir dan dalam membran sel darah merah. BChE ditemui terutamanya dalam hati dan fungsinya tidak ditakrifkan dengan jelas [41]. Walaubagaimanapun, Smith et al. [40] mengulas fungsi BChE yang mampu nyahtoksik organofosfat dan kokain. Ia boleh mampu menghidrolisis ACh pada frekuensi yang berbeza serta ester kolin lain (butyrylcholine) dan substrat sintetik lain

(butiriltiokoline iodide, propioniltiokolon iodide dan 4-aminofenil asetat).

Biopenderia berasaskan kolinesterase kebiasaannya digunakan untuk mengesan agen saraf seperti karbamat dan organofosfat. Karbamat dan organofosfat akan merencatkan separa aktiviti biologi kolinesterase masing – masing melalui proses karbamilasi dan fosforilasi pada subtapak kumpulan serina dan disini bergantung dengan prinsip biopenderia yang bergantung kepada pengesanan tiokolin, pembentukan hydrogen peroksida dan perubahan pada pH semasa tindak balas berlaku [43]. Logam berat juga mampu dikesan oleh biopenderia kolinesteres dimana kebarangkalian perencatan berlaku pada tapak aktif atau tapak allosteric enzim.

Analisis kolorimetrik berdasarkan kaedah Ellman et al. [42], 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid) atau DTNB dikenali sebagai reagen Ellman dimana sebagai penanda kehadiran aktiviti kolinesteres. Warna kuning tersebut terbentuk apabila tiokolin berfungsi untuk menurunkan DTNB dan membentuk asid 5-thio-2-nitro benzoik berwarna kuning. Sebaliknya, kolinesteres yang terencat penuh menunjukkan tiada aktiviti terhasil, manakala untuk aktiviti enzim yang separa terencat, hanya warna kuning pucat akan terhasil. Biosensor amprometrik berasaskan kolinesteres turut digunakan untuk mengesan kehadiran racun serangga dan logam dalam sesuatu sampel [45].

3.3 Perencatan Tirosinase

Tirosinase merupakan enzim dari kumpulan oksidase berperanan dalam mengehadkan kadar untuk mengawal penghasilan melanin. Enzim yang mengandungi kuprum ini terdapat dalam tisu tumbuhan dan haiwan yang memungkinkan penghasilan melanin dan pigmen lain daripada tirosin melalui pengoksidaan. Dalam beberapa tahun kebelakangan ini, banyak biosensor telah dibangunkan berdasarkan perencatan aktiviti enzim tirosinase oleh perencat yang kebanyakannya adalah racun perosak [44-48].

Berbanding dengan biopenderia kolinesterase, selain kemampuannya mengesan kehadiran racun serangga seperti organofosfat dan karbamat [51], tirosinase mampu mengesan kumpulan racun perosak yang lebih luas. Sok dan Fragoso, [52] membuktikan kesensitifan tirosinase keatas racun herba bernama glifosaf berdasarkan analisis keatas tindak balas amprometrik. Campanella et al. [53] juga menguji keatas racun herba triazinik and benzotriazinik. Haddaoui and Raouafi, [47] menunjukkan kebolehan tirosinase yang dijerapkan pada elektrod cetakan skrin gandingan karbon yang distrukturkan secara elektrokimia oleh nanopartikel ZnO, dimana kemampuan mengesan racun herba klorotoluron pada tahap sebahagian per billion; ppb.

Dari perspektif berbeza, tirosinase juga mampu mengesan kehadiran pencemaran fluoride didalam air menggunakan tindak balas amperometrik keatas kesan perencatan enzim tersebut [54]. Tambahan,

pencemaran sebatian fenol turut dapat dikesan menggunakan kaedah Tirosinase pegun pada grafin/nanozarah/kitosan emas pada jarak kepekatan dari 0.05 sehingga 15 μM . Kelemahan enzim ini adalah secara semula jadi tidak stabil disamping memendekkan jangka hayat dan kebolehgunaannya [55]. Walaubagaimanapun, tirosinase mampu bertahan pada suhu tinggi dan pelarut organik yang digunakan untuk melarutkan racun perosak [54,55].

3.4 Perencatan Urease

Ureases merupakan enzim kebergantungan nikel dimana secara fungsional tergolong dalam superfamili amidohidrolase dan fosfotriesterases iaitu enzim yang memungkinkan hidrolisis urea, iaitu sisa nitrogen utama hasil tindakan biologi lalu membentuk ammonia dan karbon dioksida. Enzim ini terdapat banyak dalam bakteria, kulat, alga, tumbuhan, dan beberapa invertebrate. Beberapa biopenderia dengan pelbagai jenis transduser yang berbeza telah dilaporkan berdasarkan perencatan aktiviti enzim urease terutamanya dalam mengesan kehadiran perencat logam berat seperti kuprum, kadmium, kromium, plumbum, dan merkuri. Kaur et al. [58] telah membezakan penggunaan biopenderia urease secara kolorimetrik dan potentiometric bagi mengesan kehadiran Pb^{2+} dalam susu. Kaedah ini sangat berkesan dari segi tindak balas yang lebih pantas, had pengesanan yang rendah, dan boleh dijana semula dengan mudah. Model kinetik perencatan tidak berbalik bagi ion merkuri dan plumbum pada biopenderia urease secara amperometri telah dicadangkan oleh Do dan Lin, [59] dimana kepekatan masing – masing mampu ditentukan sehingga 0.45 ppm dan 8.67 ppm. Rigo et al. [60] memperkenalkan biopenderia nano julur; *cantilever nanobiosensors*, yang mampu menentukan kehadiran ion logam yang lebih banyak seperti Pb^{2+} , Ni^{2+} , Cd^{2+} , Zn^{2+} , Co^{2+} dan Al^{3+} , disamping kebolehbalian berfungsi dengan enzim urease kepada tiga kali kitaran pendedahan kepada larutan Pb^{2+} . Urease sol-gel-pegun menggunakan pendekatan konduktometrik biopenderia pernah digunakan dalam menentukan kehadiran logam berat dimana kesensitifan disusun secara menurun seperti berikut; $\text{Hg}^{2+} > \text{Cu}^{2+} > \text{Cd}^{2+} > \text{Pb}^{2+}$ [61].

3.5 Perencatan Alkalina Fosfatase

Alkalina fosfatase; ALP, merupakan enzim yang terdapat terutamanya dalam hati, tulang, usus, dan buah pinggang berfungsi untuk memungkinkan tindak balas hidrolisis ester fosfatase. Enzim ini paling kerap diuji untuk diagnosis apabila terdapat tanda-tanda kemungkinan masalah hati, seperti loya dan muntah, jaundis, sakit perut, atau penurunan berat badan yang tidak dapat dijelaskan. Selain itu, ianya juga digunakan untuk menentukan keberkesanan pempasteuran pada produk tenusu seperti susu dan keju. Pembangunan biosensor yang mengeksploitasi perencatan ALP untuk menentukan kepekatan

bahan-bahan toksik seperti racun dalam sesuatu medium.

Shyuan et al. [62] membangunkan biopenderia elektrokimia berasaskan pemegungan alkaline fosfatase dengan sol-gel/kitosan disalut pada permukaan elektrod bercetak skrin, dan kaedah ini berjaya mengesan kehadiran pestisid asid 2,4-diklorofenoksiasetik sehingga 80 ppm. Kaedah pengesanan secara fluorimetri keatas racun karbamat turut diperkenalkan oleh Besombes et al. [63] dimana had pengesanan sehingga 2 μM . Kaedah yang sama turut digunakan oleh Garcia Sánchez et al. [64] dengan pengesanan bahan toksik yang lebih luas dan pelbagai seperti racun organofosfat, organoklorin dan karbamat, logam berat seperti plumbum, dan sianida. Permerhatian adalah berdasarkan perencatan aktiviti ALP pegun yang berkadar terus dengan kepekatan perencat. Perencatan aktiviti ALP pegun pada permukaan elektrod pes serbuk nanokarbon telah dieksploitasi untuk penentuan kehadiran karbofuran dalam air dan cili melalui pengesanan secara tindak balas amperometrik [65].

Gianvittorio et al. [66] membangunkan biopenderia ALP hasil fabrikasi permukaan elektrod kaca bergelas; GCE, dengan campuran nanotiub karbon berbilang dinding; *Multi-Walled-Carbon-Nanotubes*; MWCNTs, dan grafin oksida yang diturunkan secara elektrokimia; *Electrochemically-Reduced-Graphene-Oxide*; ERGO, diikuti mempegunkan enzim dengan menghubungkan silangkan albumin serum bovin dan glutaraldehid. 2-fosfo-L-askorbik sebagai substrat enzimatik manakala biopenderia tersebut diuji pada racun herba 2,4-D, malation, parathion, dan metil-paration dari kepekatan 0.02–14 nM. Keputusan menunjukkan kesensitifan biopenderia berasaskan perencatan ALP adalah tinggi sehingga nilai had pengesanan adalah pada saiz unit pM. Berbeza dengan Dong et al. [[67]] menggunakan kaedah penderia pendafLOUR dimana perencatan ALP oleh kepekatan klorpirifos berkadar songsang dengan keamatan pendafLOUR yang terhasil daripada pembentukan 3-(1,2-dihidrosietil)furo[3,4-b]quinoxalin-1(3H)-one (DFQ) hasil tindakbalas substrat asid askorbik dengan o-fenilendiamin. Kesensitifan biopenderia pada racun klorpirifos agak tinggi standing dengan biopenderia ALP/MWCNTs/ERGOGCE.

3.6 Perencatan Lakase

Lakase ialah enzim oksidase yang mengandungi kuprum yang terdapat dalam banyak mikroorganisma, tumbuhan, dan kulat. Kebiasaan penggunaan enzim ini dalam menentukan kehadiran sebatian fenolik. Walaubagaimanapun, penggunaannya sebagai biopenderia racun telah dikenal pasti. Zapp et al. [68] membangunkan biosensor menggunakan lakase untuk pengesanan sebatian karbamat iaitu metomil. Lakase dari *Aspergillus oryzae* dipegunkan pada nanopartikel platinum yang tersebar dalam 1-butyl-3-methylimidazolium tetrafluoroborate sebagai cecair

ionik. Enzim ini diuji pada lobak dan tomato yang masing – masing mengandungi 0.251 dan 0.055 mg.L⁻¹ metomil. Kesensitifan turut diverifikasikan menggunakan HPLC dengan ralat relative yang sangat kecil.

Oliveira et al., [69] membangunkan biopenderia berasaskan elektrod tampalan karbon nanotubes berbilang dinding yang diubah suai dengan lakase dari *Trametes versicolor* untuk mengesan dan penentuan kuantiti racun perosak pirimicarb. Kesensitifan enzim ini dikenal pasti pada jarak 9.90×10^{-7} to 1.15×10^{-5} mol.L⁻¹, dengan had pengesanan pada 1.8×10^{-7} mol.L⁻¹ iaitu 0.04 mg.kg⁻¹ keatas beras asam sayur segar. Dicarzol merupakan perencat AChE turut diuji dengan menggunakan lakase/AuNPs/AuE pegun. Biopenderia yang dibangunkan telah berjaya digunakan untuk penentuan agen saraf tersebut dalam mangga dan anggur. Had pengesanan yang dicapai ialah $9.5 \times 10^{-8} \pm 9.5 \times 10^{-10}$ M ($0.02 \pm 2.6 \times 10^{-4}$ mg/kg berdasarkan berat buah segar) [70].

4.0 FAKTOR – FAKTOR YANG MEMPENGARUHI KESENSITIFAN BIOPENDERIA

Salah satu faktor kritikal yang mengehadkan kesensitifan biopenderia ialah hubungan atau interaksi bioreseptor keatas analit [71]. Ini merujuk kepada tahap pengikatan analit kepada bioreseptor, yang boleh menjejaskan kestabilan biopenderia. Selain itu, faktor lain yang terlibat ialah had pengesanan dipengaruhi oleh anjakan fasa terkecil yang boleh dikesan [72]. Ini bermakna biosensor mesti mampu mengesan walaupun perubahan kecil dalam kepekatan analit untuk dianggap sensitif. Tambahan pula, transduser yang digunakan dalam biopenderia juga merupakan faktor pengehad dalam keberkesannya. Pembangunan sistem mikroelektromekanikal kepekaan tinggi telah meningkatkan kesensitifan biopenderia dengan ketara. Walaubagaimanapun, kesensitifan transduser, ditambah dengan interaksi dan pertalian bioreseptor, akhirnya menentukan kepekaan keseluruhan biosensor.

Faktor luaran turut menyebabkan fungsi bioreseptor seperti enzim yang memberi kesan kepada kurangnya kesensitifan biopenderia. Antaranya ialah suhu yang terlalu rendah menyebabkan kegagalan pembentukan kompleks enzim-substrat manakala suhu terlalu tinggi menyebabkan perubahan struktur enzim lalu terdegradasi. pH turut memberikan kesan kepada fungsi optimum biopenderia dimana menyediakan keadaan yang baik bagi pembentukan kompleks enzim-substrat lalu menghasilkan produk. Perubahan pH boleh mengubah cas dan bentuk enzim, mengagalkan penghasilan produk. Kesan yang sama turut terjadi pada pendedahan kepada cahaya boleh menyebabkan enzim kehilangan aktiviti kerana kerosakan fotokimia yang boleh berlaku

dalam molekul enzim. Begitu juga dengan oksigen atmosfera yang boleh bertindak balas dengan enzim untuk membentuk spesies oksigen reaktif (ROS), yang memberi kesan kerosakan oksidatif kepada struktur enzim [73, 74]. Jadi, memahami kewujudan faktor-faktor tersebut membolehkan penyelidik atau penguna biopenderia untuk lebih berhati – hati dalam pengendalian supaya jangka hayat peranti yang digunakan akan bertahan lebih lama.

Tidak dinafikan penggunaan enzim pegun memberikan impak positif kepada fungsi enzim sebagai biopenderia. Penggunaan enzim pegun seperti dalam filem sol-gel, silika atau kalsium alginat berperanan penting untuk memastikan dan meningkatkan kestabilan, meningkatkan sensitiviti, mengurangkan gangguan, meningkatkan kebolehgunaan semula dan memudahkan pengesanan disamping jangka hayat yang lebih panjang. Faedah ini menjadikan imobilisasi enzim sebagai teknik yang berharga untuk meningkatkan prestasi dan kebolehpercayaan biopenderia dalam pelbagai aplikasi, termasuk pemantauan alam sekitar dan keselamatan makanan [75].

5.0 KESIMPULAN

Biopenderia telah dilaporkan bagi mengesan kehadiran racun perosak dan bahan kimia industri yang biasa digunakan berpotensi untuk mencemari sumber air dan makanan yang terdedah. Dalam sesetengah kes terdapat keperluan untuk penambahbaikan dari segi kesensitifan dan jangka hayat kerana teknik konvensional boleh mengatasi prestasi biopenderia dalam aspek ini pada masa ini. Sebilangan besar aplikasi biopenderia untuk analisis dan biopemantauan alam sekitar masih belum lagi memberi kesan komersial yang ketara. Walaubagaimanapun, fungsinya jelas sebagai langkah awalan bagi menentukan takat cemar sesuatu kawasan. Contohnya, saringan awal untuk pemantauan alam sekitar, biopenderia akan digunakan untuk situasi di mana sebatian pencemar diketahui, atau telah dikenal pasti, tetapi data yang dijana adalah lebih laju dan mampu ditentukan tahap cemar pada jangka masa yang singkat. Seterusnya saringan sekunder menggunakan teknik analisis konvensional seperti kromatografi gas dan kromatografi cecair tekanan tinggi mempunyai kelebihan kerana dapat mengenalpasti dan mengkuantifikasikan bahan cemar. Pemantauan berterusan kompaun kemudiannya boleh dilakukan dengan murah dan boleh dipercayai. Aplikasi yang sesuai adalah untuk memantau aktiviti pertanian dan efluen kilang yang produk buangnya telah dikenalpasti. Pelepasan melebihi had undang-undang kemudiannya boleh dikesan pada asas masa nyata. Dengan kepelbagaian sumber biopenderia yang telah dibincangkan, kaedah ini boleh dikembangkan menggunakan sumber – sumber tempatan serta

menyumbang ke arah kemajuan memantau operasi pembersihan selepas tumpahan bahan kimia tertentu yang mencemari alam sekitar. Sejajar itu, perlu difahami kesensitifan biopenderia dihadkan oleh beberapa faktor, termasuk pertalian bioresseptor, had pengesanan dan kepekaan transduser. Selain itu, fungsi bioresseptor akan berubah sekiranya terdapat tekanan luaran seperti pH, suhu, cahaya dan oksigen atmosfera. Memahami faktor-faktor ini adalah penting dalam membangunkan biosensor dengan kepekaan dan ketepatan yang lebih besar untuk pelbagai aplikasi dalam penyelidikan saintifik. Adalah jelas bahawa bidang pemantauan alam sekitar menunjukkan beberapa peluang khusus dimana biopenderia boleh dieksploitasi secara menguntungkan.

PENGHARGAAN

Kajian ini di bawah tajaan Universiti Malaysia Sabah berkod UMSGreat: GUG0500-1/2020.

Rujukan

- [1] El Harrad, L., Bourais, I., Mohammadi, H., & Amine, A. 2018. Recent Advances in Electrochemical Biosensors Based on Enzyme Inhibition for Clinical and Pharmaceutical Applications. *Sensors (Basel, Switzerland)*. 18(1): 164. <https://doi.org/10.3390/s18010164>.
- [2] Rocchitta, G., Spanu, A., Babudieri, S., Latte, G., Madeddu, G., Galleri, G., Serra, P. A. 2016. Enzyme Biosensors for Biomedical Applications: Strategies for Safeguarding Analytical Performances in Biological Fluids. *Sensors (Basel, Switzerland)*. 16(6): 780. <https://doi.org/10.3390/s16060780>.
- [3] Kucherenko, I. S., Soldatkin, O. O., Dzyadevych, S. V., & Soldatkin, A. P. 2020. Electrochemical Biosensors based on Multienzyme Systems: Main Groups, Advantages and Limitations – A Review. *Analytica Chimica Acta*. 1111: 114-131. <https://doi.org/10.1016/j.oca.2020.03.034>.
- [4] Clark, L. C., & Lyons, C. 1962. Electrode Systems for Continuous Monitoring in Cardiovascular Surgery. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 102: 29-45. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1962.tb13623.x>.
- [5] Fapyane, D., Berillo, D., Marty, J. L., & Revsbech, N. P. 2020. Urea Biosensor Based on a CO₂ Microsensor. *ACS Omega*. 5(42): 27582-27590. <https://doi.org/10.1021/acsomega.0c04146>.
- [6] Rahman, M. M. 2014. Reusable and Mediator-Free Cholesterol Biosensor Based on Cholesterol Oxidase Immobilized onto TGA-SAM Modified Smart Bio-chips. *PLOS ONE*. 9(6): e100327. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0100327>.
- [7] Pontius, K., Semenova, D., Silina, Y. E., Gernaey, K. V., & Junicke, H. 2020. Automated Electrochemical Glucose Biosensor Platform as an Efficient Tool Toward On-Line Fermentation Monitoring: Novel Application Approaches and Insights. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. 8.
- [8] Khalidi, S. A. M., Sabullah, M. K., Gansau, J. A., Faik, A. A. M., Sanj, S. A., Jawan, R., Shukor, M. Y. 2022. Enzyme Inhibition-based Biosensors using Acetylcholinesterase from *Monopterus albus* for Detection of Carbamates Contamination. *Journal of Physics: Conference Series*. 2314(1): 012021. <https://doi.org/10.1088/1742-6596/2314/1/012021>.
- [9] Bucur, B., Purcarea, C., Andreescu, S., & Vasilescu, A. 2021. Addressing the Selectivity of Enzyme Biosensors: Solutions and Perspectives. *Sensors*. 21(9): 3038. <https://doi.org/10.3390/s21093038>.
- [10] Sabullah, M. K. 2020. Pembangunan Biopenderia Enzim Berasaskan Kolinasterase untuk Mengesan Kehadiran Bahan Cemar seperti Racun Serangga dan Logam Berat. *Sains Malaysiana*. 49(11): 2659-2665.
- [11] Sabullah, M. K., Sulaiman, M. R., Shukor, M. Y. A., Shamaan, N. A., Khalid, A., & Ahmad, S. A. 2015. In Vitro and In Vivo Effects of *Puntius javanicus* Cholinesterase by Copper. *Fresenius Environmental Bulletin*. 24(12B): 4615-4621.
- [12] Sabullah, M. K., Ahmad, S. A., Shukor, M. Y., Shamaan, N. A., Khalid, A., Gansau, A. J., Sulaiman, M. R. 2015. Acetylcholinesterase from *Puntius javanicus* for the Detection of Carbamates and Organophosphates. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Sciences*: 8(2): 348-353.
- [13] Ahmad, S. A., Sabullah, M. K., Basirun, A. A., Khalid, A., Yasid, N. A., Iqbal, I. M., Shukor, M. Y. 2016. Evaluation of Cholinesterase from the Muscle and Blood of *Anabas testudineus* as Detection of Metal Ions. *Fresenius Environmental Bulletin*. 25(10): 4253-4260.
- [14] Kitz, R., & Wilson, I. B. 1962. Esters of Methanesulfonic Acid as Irreversible Inhibitors of Acetylcholinesterase. *The Journal of Biological Chemistry*. 237: 3245-3249.
- [15] Siddiqui, K. S., Ertan, H., Poljak, A., & Bridge, W. J. 2022. Evaluating Enzymatic Productivity—The Missing Link to Enzyme Utility. *International Journal of Molecular Sciences*. 23(13): 6908. <https://doi.org/10.3390/ijms23136908>.
- [16] Han, S., Zhu, M., Yuan, Z., & Li, X. 2001. A Methylene Blue-mediated Enzyme Electrode for the Determination of Trace Mercury(II), Mercury(I), Methylmercury, and Mercury-glutathione Complex. *Biosensors and Bioelectronics*. 16(1): 9-16. [https://doi.org/10.1016/S0956-5663\(00\)00114-7](https://doi.org/10.1016/S0956-5663(00)00114-7).
- [17] Zhang, S., Zhao, H., & John, R. 2001. A Theoretical Model for Immobilized Enzyme Inhibition Biosensors. *Electroanalysis*. 13(18): 1528-1534. [https://doi.org/10.1002/1521-4109\(200112\)13:18<1528::AID-ELAN1528>3.0.CO;2-1](https://doi.org/10.1002/1521-4109(200112)13:18<1528::AID-ELAN1528>3.0.CO;2-1).
- [18] Yadav, J., Paragas, E., Korzekwa, K., & Nagar, S. 2020. Time-dependent Enzyme Inactivation: Numerical Analyses of in Vitro Data and Prediction of Drug-drug Interactions. *Pharmacology & therapeutics*. 206: 107449. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2019.107449>.
- [19] Aidil, M. S., Sabullah, M. K., Halmi, M. I. E., Sulaiman, R., Shukor, M. S., Shukor, M. Y., Syahir, A. 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.
- [20] Ghica, M. E., Carvalho, R. C., Amine, A., & Brett, C. M. A. 2013. Glucose Oxidase Enzyme Inhibition Sensors for Heavy Metals at Carbon Film Electrodes Modified with Cobalt or Copper Hexacyanoferrate. *Sensors and Actuators B: Chemical*. 178: 270-278. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2012.12.113>.
- [21] Nordin, N., Abdulla, R., Ahmad, S. A., & Sabullah, M. K. 2021. Acetylcholinesterase (AChE) of Diodon Hystrix Brain as an Alternative Biomolecule in Heavy Metals Biosensing. *Journal of Applied Science and Engineering*. 25(3): 473-480. [https://doi.org/10.6180/jase.202206_25\(3\).0014](https://doi.org/10.6180/jase.202206_25(3).0014).
- [22] Attaallah, R., & Amine, A. 2021. The Kinetic and Analytical Aspects of Enzyme Competitive Inhibition: Sensing of Tyrosinase Inhibitors. *Biosensors*. 11(9): 322. <https://doi.org/10.3390/bios11090322>.
- [23] Mohd Razib, M. S., Latip, W., Abdul Rashid, J. I., Knight, V. F., Wan Yunus, W. M. Z., Ong, K. K., Mohd Noor, S. A. 2021. An Enzyme-Based Biosensor for the Detection of Organophosphate Compounds Using Mutant Phosphotriesterase Immobilized onto Reduced Graphene Oxide. *Journal of Chemistry*. 2021: e2231089. <https://doi.org/10.1155/2021/2231089>.

- [24] Narayanan, M. M., Nair, C. B., Sanjeeva, S. K., Rao, P. S., Pullela, P. K., & Barrow, C. J. 2013. Design of Multiligand Inhibitors for the Swine flu H1N1 Neuraminidase Binding Site. *Advances and Applications in Bioinformatics and Chemistry: AABC*. 6: 47-53. Doi: <https://doi.org/10.2147/AABC.S49503>.
- [25] Fiedorowicz, J. G., & Swartz, K. L. 2004. The Role of Monoamine Oxidase Inhibitors in Current Psychiatric Practice. *Journal of Psychiatric Practice*. 10(4): 239-248.
- [26] Rodríguez-Delgado, M. M., Alemán-Nava, G. S., Rodríguez-Delgado, J. M., Dieck-Assad, G., Martínez-Chapa, S. O., Barceló, D., & Parra, R. 2015. Laccase-based Biosensors for Detection of Phenolic Compounds. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 74: 21-45. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.trac.2015.05.008>.
- [27] Hayat, N. M., Ahmad, S. A., Shamaan, N. A., Jlah, M. K. S., Shukor, M. Y. A., Syed, M. A., 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: <https://doi.org/10.22438/jeb/38/3/MRN-987>.
- [28] Shukor, Y., Baharom, N. A., Rahman, F. Abd., Abdullah, Mohd. P., Shamaan, N. A., & Syed, Mohd. A. 2006. Development of a Heavy Metals Enzymatic-based Assay using Papain. *Analytica Chimica Acta*. 566(2): 283-289. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.aca.2006.03.001>.
- [29] Guo, M., & Wang, G. 2016. Milk Protein Polymer and Its Application in Environmentally Safe Adhesives. *Polymers*. 8(9): 324. Doi: <https://doi.org/10.3390/polym8090324>.
- [30] Lowe, G. 1976. The Cysteine Proteinases. *Tetrahedron*. 32(3): 291-302. Doi: [https://doi.org/10.1016/0040-4020\(76\)80040-3](https://doi.org/10.1016/0040-4020(76)80040-3).
- [31] Shouket, H. A., Ameen, I., Tursunov, O., Kholikova, K., Pirmov, O., Kurbonov, N., Mukimov, B. 2020. Study on Industrial Applications of Papain: A Succinct Review. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*. 614(1): 012171. Doi: <https://doi.org/10.1088/1755-1315/614/1/012171>.
- [32] Baldi-Mood, M., Naseri, K., Tahergorabi, Z., Khazdair, M. R., & Sadeghi, M. 2021. Toxic Mechanisms of Five Heavy Metals: Mercury, Lead, Chromium, Cadmium, and Arsenic. *Frontiers in Pharmacology*. 12. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphar.2021.643972>.
- [33] Witkowska, D., Stowik, J., & Chilicka, K. 2021. Heavy Metals and Human Health: Possible Exposure Pathways and the Competition for Protein Binding Sites. *Molecules*. 26(19): 6060. Doi: <https://doi.org/10.3390/molecules26196060>.
- [34] Lai, C., Qin, L., Zeng, G., Liu, Y., Huang, D., Zhang, C., Wang, M. 2016. Sensitive and Selective Detection of Mercury Ions based on Papain and 2,6-pyridinedicarboxylic Acid Functionalized Gold Nanoparticles. *RSC Advances*. 6(4): 3259-3266. Doi: <https://doi.org/10.1039/C5RA23157D>.
- [35] Shukor, M. Y., Masdor, N., Baharom, N. A., Jamal, J. A., Abdullah, M. P. A., Shamaan, N. A., & Syed, M. A. 2008. An Inhibitive Determination Method for Heavy Metals using Bromelain, a Cysteine Protease. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 144(3): 283-291. Doi: <https://doi.org/10.1007/s12010-007-8063-5>.
- [36] Baskaran, G., Masdor, N. A., Syed, M. A., & Shukor, M. Y. 2013. An Inhibitive Enzyme Assay to Detect Mercury and Zinc Using Protease from *Coriandrum sativum*. *The Scientific World Journal*. 2013: e678356. Doi: <https://doi.org/10.1155/2013/678356>.
- [37] Uba, G., Manogaran, M., Gunasekaran, B., Halmi, M. I. E., & Shukor, M. Y. A. 2020. Improvement of Ficin-Based Inhibitive Enzyme Assay for Toxic Metals Using Response Surface Methodology and Its Application for Near Real-Time Monitoring of Mercury in Marine Waters. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 17(22): 8585. Doi: <https://doi.org/10.3390/ijerph17228585>.
- [38] Tarek, H., Nam, K. B., Kim, Y. K., Suchi, S. A., & Yoo, J. C. 2023. Biochemical Characterization and Application of a Detergent Stable, Antimicrobial and Antibiofilm Potential Protease from *Bacillus siamensis*. *International Journal of Molecular Sciences*. 24(6): 5774. <https://doi.org/10.3390/ijms24065774>.
- [39] Holmquist, M. 2000. Alpha/Beta-hydrolase Fold Enzymes: Structures, Functions and Mechanisms. *Current Protein & Peptide Science*. 1(2): 209-235. Doi: <https://doi.org/10.2174/138920300381405>.
- [40] Lenfant, N., Hotelier, T., Bourne, Y., Marchot, P., & Chatonnet, A. 2013. Proteins with an Alpha/Beta Hydrolase Fold: Relationships between Subfamilies in an Ever-growing Superfamily. *Chemico-Biological Interactions*. 203(1): 266-268. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2012.09.003>.
- [41] Falugi, C. 2012. Early Appearance and Possible Functions of Non-neuromuscular Cholinesterase Activities. *Frontiers in Molecular Neuroscience*. 5. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnmol.2012.00054>.
- [42] Groner, E., Ashani, Y., Schorer-Apelbaum, D., Sterling, J., Herzig, Y., & Weinstock, M. 2007. The Kinetics of Inhibition of Human Acetylcholinesterase and Butyrylcholinesterase by Two Series of Novel Carbamates. *Molecular Pharmacology*. 71(6): 1610-1617. Doi: <https://doi.org/10.1124/mol.107.033928>.
- [43] Smith, P. N., Mao, L., Sinha, K., & Russell, A. J. 2021. Organophosphate Detoxification by Membrane-engineered Red Blood Cells. *Acta Biomaterialia*. 124: 270-281. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2021.01.043>.
- [44] Jaffrezic-Renault, N. 2001. New Trends in Biosensors for Organophosphorus Pesticides. *Sensors*. 1(2): 60-74. Doi: <https://doi.org/10.3390/s10100060>.
- [45] Ellman, G. L., Courtney, K. D., Andres, V., & Featherstone, R. M. 1961. A New and Rapid Colorimetric Determination of Acetylcholinesterase Activity. *Biochemical Pharmacology*. 7(2): 88-95. Doi: [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(61\)90145-9](https://doi.org/10.1016/0006-2952(61)90145-9).
- [46] Basirun, A. A., Ahmad, S. A., Yasid, N. A., Sabullah, M. K., Daud, H. M., Sha'arani, S., Shukor, M. Y. 2019. 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: <https://doi.org/10.1007/s13762-018-1711-1>.
- [47] Han, E., Yang, Y., He, Z., Cai, J., Zhang, X., & Dong, X. 2015. Development of Tyrosinase Biosensor based on Quantum Dots/chitosan Nanocomposite for Detection of Phenolic Compounds. *Analytical Biochemistry*. 486: 102-106. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.ab.2015.07.001>.
- [48] Haddaoui, M., & Raouafi, N. 2015. Chloroturon-induced Enzymatic Activity Inhibition in Tyrosinase/ZnO NPs/SPCE Sensor for the Detection of Ppb Levels of Herbicide. *Sensors and Actuators B: Chemical*. 219: 171-178. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.snb.2015.05.023>.
- [49] Arduini, F., Cinti, S., Caratelli, V., Amendola, L., Palleschi, G., & Moscone, D. 2019. Origami Multiple Paper-based Electrochemical Biosensors for Pesticide Detection. *Biosensors and Bioelectronics*. 126: 346-354. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.bios.2018.10.014>.
- [50] Erkmen, C., Kurbanoglu, S., & Uslu, B. 2020. Fabrication of Poly(3,4-ethylenedioxythiophene)-iridium Oxide Nanocomposite based Tyrosinase Biosensor for the Dual Detection of Catechol and Azinphos Methyl. *Sensors and Actuators B: Chemical*. 316: 128121. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.snb.2020.128121>.
- [51] Wang, D., Liu, D., Duan, H., Xu, Y., Zhou, Z., & Wang, P. 2020. Catechol Dyes-Tyrosinase System for Colorimetric Determination and Discrimination of Dithiocarbamate

- Pesticides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 68(34): 9252-9259.
Doi: <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.0c03352>.
- [52] Tanimoto de Albuquerque, Y. D., & Ferreira, L. F. 2007. Amperometric Biosensing of Carbamate and Organophosphate Pesticides Utilizing Screen-printed Tyrosinase-modified Electrodes. *Analytica Chimica Acta*. 596(2): 210-221.
Doi: <https://doi.org/10.1016/j.aca.2007.06.013>.
- [53] Sok, V., & Fragoso, A. 2019. Amperometric Biosensor for Glyphosate based on the Inhibition of Tyrosinase Conjugated to Carbon Nano-onions in a Chitosan Matrix on a Screen-printed Electrode. *Microchimica Acta*. 186(8): 569.
<https://doi.org/10.1007/s00604-019-3672-6>.
- [54] Campanella, L., Dragone, R., Lelo, D., Martini, E., & Tomassetti, M. 2006. Tyrosinase Inhibition Organic Phase Biosensor for Triazinic and Benzotriazinic Pesticide Analysis (Part Two). *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 384(4): 915-921.
Doi: <https://doi.org/10.1007/s00216-005-0175-6>.
- [55] Asav, E., Yorganci, E., & Akyilmaz, E. 2009. An Inhibition Type Amperometric Biosensor based on Tyrosinase Enzyme for Fluoride Determination. *Talanta*. 78(2): 553-556.
Doi: <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2008.12.010>.
- [56] Carralero, V., Mena, M. L., Gonzalez-Cortés, A., Yáñez-Sedeño, P., & Pingarrón, J. M. 2006. Development of a High Analytical Performance-tyrosinase Biosensor based on a Composite Graphite-Teflon Electrode Modified with Gold Nanoparticles. *Biosensors and Bioelectronics*. 22(5): 730-736.
Doi: <https://doi.org/10.1016/j.bios.2006.02.012>.
- [57] Solé, S., Merkoçi, A., & Alegret, S. 2003. Determination of Toxic Substances Based on Enzyme Inhibition. Part I. Electrochemical Biosensors for the Determination of Pesticides Using Batch Procedures. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*. 33(2): 89-126.
Doi: <https://doi.org/10.1080/727072334>.
- [58] Sassolas, A., Prieto-Simón, B., & Marty, J. L. 2012. Biosensors for Pesticide Detection: New Trends. *American Journal of Analytical Chemistry*. 3(3): 210-232.
Doi: <https://doi.org/10.4236/ajac.2012.33030>.
- [59] Kaur, H., Kumar, S., & Verma, N. 2014. Enzyme-based Colorimetric and Potentiometric Biosensor for Detecting Pb (II) Ions in Milk. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. 57: 613-619.
Doi: <https://doi.org/10.1590/S1516-8913201402160>.
- [60] Do, J. S., & Lin, K. H. 2016. Kinetics of Urease Inhibition-based Amperometric Biosensors for Mercury and Lead Ions Detection. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*. 63: 25-32.
Doi: <https://doi.org/10.1016/j.jtice.2016.03.011>.
- [61] Rigo, A. A., Cezaro, A. M. de, Muenchen, D. K., Martinazzo, J., Brezolin, A. N., Hoehne, L., Steffens, C. 2020. Cantilever Nanobiosensor based on the Enzyme Urease for Detection of Heavy Metals. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*. 36: 1429-1437.
Doi: <https://doi.org/10.1590/0104-6632.20190364s20190035>.
- [62] Lee, S. M., & Lee, W. Y. 2002. Determination of Heavy Metal Ions Using Conductometric Biosensor Based on Sol-Gel Immobilized Urease. *Bulletin of the Korean Chemical Society*. 23(8): 1169-1172.
Doi: <https://doi.org/10.5012/bkcs.2002.23.8.1169>.
- [63] Shyuan, L. K., Heng, L. Y., Ahmad, M., Aziz, S. A., & Ishak, Z. 2008. Biopenderia Elektrokimia Berasaskan Enzim Alkaline Fosfatase Terpegun untuk Pengesanan Ketoksikan Asid 2,4-Diklorofenoksiasetik. *Malaysian Journal of Analytical Sciences*. 12(2): 473-479.
- [64] Besombes, J.-L., Cosnier, S., Labbé, P., & Reverdy, G. 1995. A Biosensor as Warning Device for the Detection of Cyanide, Chlorophenols, Atrazine and Carbamate Pesticides. *Analytica Chimica Acta*. 311(3): 255-263.
Doi: [https://doi.org/10.1016/0003-2670\(94\)00686-G](https://doi.org/10.1016/0003-2670(94)00686-G).
- [65] García Sánchez, F., Navas Díaz, A., Ramos Peinado, M. C., & Belledone, C. 2003. Free and Sol-gel Immobilized Alkaline Phosphatase-based Biosensor for the Determination of Pesticides and Inorganic Compounds. *Analytica Chimica Acta*. 484(1): 45-51.
Doi: [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(03\)00310-6](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(03)00310-6).
- [66] Samphao, A., Suebsanoh, P., Wongsu, Y., Pekec, B., Jitchareon, J., & Kalcher, and. 2013. Alkaline Phosphatase Inhibition-based Amperometric Biosensor for the Detection of Carbofuran. *International Journal of Electrochemical Science*. 8.
- [67] Gianvittorio, S., Gualandi, I., & Tonelli, D. 2023. ALP-Based Biosensors Employing Electrodes Modified with Carbon Nanomaterials for Pesticides Detection. *Molecules*. 28(4): 1532.
Doi: <https://doi.org/10.3390/molecules28041532>.
- [68] Dong, J., Yang, H., Li, Y., Liu, A., Wei, W., & Liu, S. 2020. Fluorescence Sensor for Organophosphorus Pesticide Detection based on the Alkaline Phosphatase-triggered Reaction. *Analytica Chimica Acta*. 1131: 102-108.
Doi: <https://doi.org/10.1016/j.aca.2020.07.048>.
- [69] Zapp, E., Brondani, D., Vieira, I. C., Scheeren, C. W., Dupont, J., Barbosa, A. M. J., & Ferreira, V. S. 2011. Biomonitoring of Methomyl Pesticide by Laccase Inhibition on Sensor Containing Platinum Nanoparticles in Ionic Liquid Phase Supported in Montmorillonite. *Sensors and Actuators B: Chemical*. 155(1): 331-339.
Doi: <https://doi.org/10.1016/j.snb.2011.04.015>.
- [70] Oliveira, T. M. B. F., Fátima Barroso, M., Morais, S., de Lima-Neto, P., Correia, A. N., Oliveira, M. B. P. P., & Delerue-Matos, C. 2013. Biosensor based on Multi-walled Carbon Nanotubes Paste Electrode Modified with Laccase for Pirimicarb Pesticide Quantification. *Talanta*. 106: 137-143.
Doi: <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2012.12.017>.
- [71] Ribeiro, F. W. P., Barroso, M. F., Morais, S., Viswanathan, S., de Lima-Neto, P., Correia, A. N., Delerue-Matos, C. 2014. Simple Laccase-based Biosensor for Fometanate Hydrochloride Quantification in Fruits. *Bioelectrochemistry*. 95: 7-14.
Doi: <https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2013.09.005>.
- [72] Bhalla, N., Jolly, P., Formisano, N., & Estrela, P. 2016. Introduction to Biosensors. *Essays in Biochemistry*. 60(1): 1-8.
Doi: <https://doi.org/10.1042/EBC20150001>.
- [73] Martens, D., & Bienstman, P. 2019. Study on the Limit of Detection in MZI-based Biosensor Systems. *Scientific Reports*. 9(1): 5767.
Doi: <https://doi.org/10.1038/s41598-019-42305-8>.
- [74] Robinson, P. K. 2015. Enzymes: Principles and Biotechnological Applications. *Essays in Biochemistry*. 59: 1-41.
Doi: <https://doi.org/10.1042/bse0590001>.
- [75] Nguyen, H. H., Lee, S. H., Lee, U. J., Fermin, C. D., & Kim, M. 2019. Immobilized Enzymes in Biosensor Applications. *Materials*. 12(1): 121.
Doi: <https://doi.org/10.3390/ma12010121>.