

Mengkaji Tindakbalas Nanozarah Silika Dioksida (SiO_2) dengan Lisozim Dalam Larutan Penimbal

Study the Interaction of Silica Dioxide (SiO_2) Nanoparticles with Lysozymes in Buffer Solution

Open
Access

Siti Amira Othman^{1,*}, Shahidan Radiman²

¹ Jabatan Fizik dan Kimia, Fakulti Sains Gunaan dan Teknologi, Universiti Tun Hussein Onn Malaysia, 84600 Pagoh, Johor, Malaysia

² Jabatan Fizik Gunaan, Fakulti Sains dan Teknologi, Universiti Kebangsaan Malaysia, 43600, Bangi, Malaysia

ARTICLE INFO

Article history:

Received 17 August 2020

Received in revised form 18 September 2020

Accepted 21 September 2020

Available online 11 January 2021

ABSTRACT

Kajian ini dilakukan untuk mengkaji kesan tindak balas nanozarah polimer, silika dioksida (SiO_2) dengan protein, (Lisozim) dalam larutan penimbal. Tujuan kajian adalah untuk menentukan kestabilan serta kesan interaksi nanozarah SiO_2 dengan lisozim sebagai fungsi kepekatan yang dikaji dengan menggunakan spektroskopi ultralembayung-cahaya nampak (U.V.-Visible). Kaedah yang digunakan dalam kajian ini iaitu kaedah penambahan (serbuk), kaedah cecair homogen, kaedah perpisahan fasa dan kaedah penyerapan (tindakbalas). Hasil kajian mendapati penyerapan lisozim yang bercas positif (hidrofobik) terhadap permukaan nanozarah SiO_2 yang bercas negatif (hidrofilik) adalah sesuai pada pH 7.8. Bagi perbezaan nisbah berat SiO_2 : Lisozim sama ada berat lisozim atau SiO_2 tetap, puncak yang diperolehi adalah sekitar 280nm. Kadar penyerapan lisozim bergantung kepada masa tindak balas dan juga faktor pembauran. Saiz nanozarah SiO_2 yang kecil menyebabkan ianya mempunyai luas permukaan yang besar berbanding isipadu dan membolehkan lisozim dijerap pada permukaannya tanpa sebarang halangan. Oleh yang demikian dapat disimpulkan bahawa, wujud kestabilan antara lisozim dan SiO_2 yang membolehkan penyerapan berlaku dan terbentuknya gumpalan akibat daripada kesan tindak balas.

This study was conducted to study the interaction effect of polymer nanoparticles, silica dioxide (SiO_2) with protein, (Lysozyme) in buffer solution. The purpose of the study was to determine the stability and the effect of the interaction of SiO_2 nanoparticles with lysozyme as a concentration function studied using ultraviolet-visible (U.V.-visible) spectroscopy. The methods used in this study are the addition method (powder), homogeneous liquid method, phase separation method and absorption method (interaction). The results of the study found that the adsorption of positively charged (hydrophobic) lysozyme to the surface of negatively charged SiO_2 nanoparticles (hydrophilic) is suitable at pH 7.8. For the difference weight ratio in SiO_2 : Lysozyme either lysozyme weight or fixed SiO_2 , the peak obtained is around 280nm. The rate of absorption of lysozyme depends on the reaction time as well as the diffusion factor. The small size of the SiO_2 nanoparticles causes it to have a large surface area compared to the volume and allows lysozymes to be adsorbed on its surface without any obstruction. Therefore, it can be concluded that there is a stability between lysozyme and SiO_2 that

* Corresponding author.

E-mail address: sitiamira@uthm.edu.my

<https://doi.org/10.37934/arfmts.79.2.1126>

allows adsorption to occur and the formation of agglomeration as a result of the interaction effect.

Keywords:

Silika dioksida; lisozim; larutan penimbal;
nanozarah

*Silica dioxide; lysozyme; buffer solution;
nanoparticle*

Copyright © 2021 PENERBIT AKADEMIA BARU - All rights reserved

1. Pengenalan

Penjerapan protein ke atas permukaan bukan biologi adalah amat penting dalam banyak bidang kajian hari ini [1]. Kajian ke atas fenomena ini menyumbang kepada banyak bidang seperti bio-bahan, bio-pengesan dan sistem penghantaran [2]. Walaupun begitu masih lagi sukar untuk memahami proses penjerapan protein [3]. Kajian berkenaan penjerapan dan perubahan bentuk protein pada pelbagai jenis permukaan dan pada pelbagai keadaan penjerapan perlu dikaji. Ini adalah untuk memahami struktur protein dan fungsinya pada permukaan pepejal-cecair [4-8].

Proses penjerapan protein adalah proses yang kompleks kerana terdapat banyak faktor yang mempengaruhi tarikan protein pada sesuatu permukaan seperti kestabilan struktur protein, kekuatan ionik, larutan pH dan permukaan serapan hidrofobik [9-13]. Terdapat kajian yang melaporkan bahawa komposisi rangka protein mempunyai tarikan yang kuat dengan sifat permukaan nanozarah [23]. Maka, kaedah pemisahan yang telah digunakan untuk mengasingkan rangka protein dan zarah yang terikat termasuklah kaedah kromatografi, kaedah magnet dan kaedah pengemparan. Nanozarah SiO₂ digunakan di dalam kajian ini disebabkan sifatnya sebagai pembawa, mempunyai kestabilan sistemik dan biokeserasian yang baik, bersifat hidrofobik dan rintang terhadap perubahan pH [24].

Selain itu, pengkelompokkan atau pengumpulan pada lapisan penjerapan adalah kesan daripada ketidakstabilan semasa proses penyimpanan dan penghantaran protein [14-15]. Langkah untuk meminimumkan pembentukan gumpalan perlu dilakukan dan surfaktan selalunya digunakan bagi mengurangkan gumpalan.

Pembauran zarah yang berada dalam larutan ditentang oleh kelikatan larutan, jadi zarah tersebar melalui larutan lebih perlahan apabila kelikatan larutan meningkat. Disebabkan perubahan keamatan isyarat dipengaruhi oleh pergerakan zarah, sebarang zarah yang membaur lebih cepat adalah dinyatakan oleh masa perubahan keamatan isyarat yang kecil. Pekali pembauran (D) adalah berkadar songsang dengan saiz zarah. Maka, semakin kecil zarah, semakin pendek perubahan masa yang diperolehi.

$$D = \frac{K T}{6\pi\eta r} \quad (1)$$

Di mana, K = Pekali Boltzman (1.3806504 X 10⁻²³ JK⁻¹)

T = Suhu (dalam Kelvin) (298K)

η = Kelikatan dalam cecair (0.8872 cP)

r = Jejari zarah (nm)

Dalam kajian ini akan dilihat bagaimana lisozim yang bertindak sebagai protein dikaji sifat penjerapannya pada permukaan silika dioksida dalam keadaan pH yang neutral. Lisozim adalah protein yang bercas positif pada pH neutral dan mampu menembusi ke dalam mikrosfera yang bercas negatif.

2. Bahan dan Kaedah

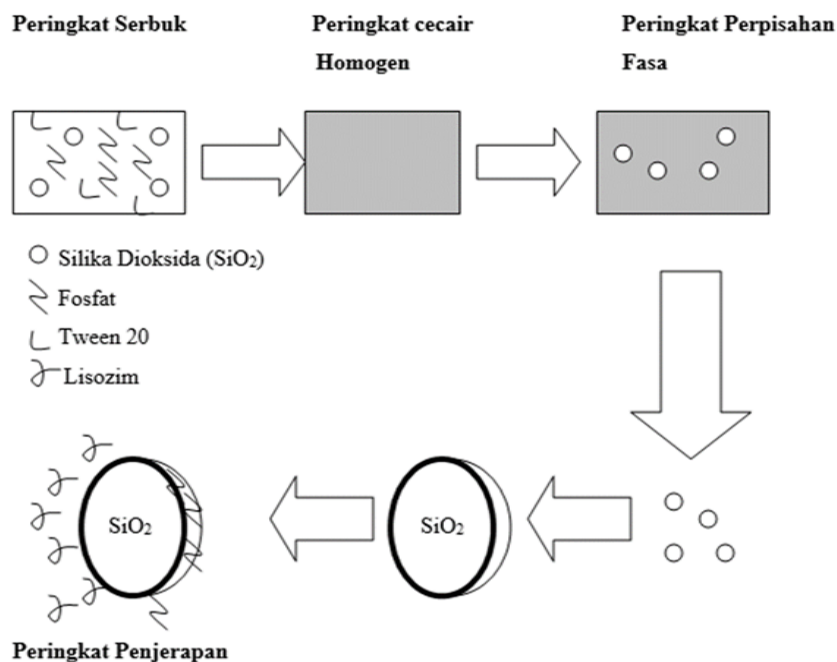
2.1 Bahan

Bahan kimia yang digunakan dalam kajian ini adalah telur putih ayam lisozim (protein) (No. Lot. 62971) . Jisim molekul lisozim adalah 14.3 kDa, pI 11.1 dan dimensinya adalah $4.6 \times 3.0 \times 3.0$ nm. Selain itu, silika dioksida (SiO_2) (Aerosil 380) (No. Lot. 60287) dan tween 20 (surfaktan) (No. Lot. 93773) juga digunakan. Semua proses penjerapan dilakukan dalam campuran larutan penimbal potassium dihidrogen fosfat (KH_2PO_4) dan sodium hidroksida (NaOH) Telur putih ayam lisozim dibeli dari Fluka. Pencirian bahan dilakukan menggunakan Spektroskopi UV-boleh nampak dan Spektroskopi Korelasi Foton.

2.2 Kaedah

2.2.1 Penyediaan larutan penimbal fosfat

Larutan penimbal (pH 7.0-pH 8.0) disediakan dengan menambah 100 ml 0.1M KH_2PO_4 dan 0.1M NaOH (kuantiti isipadu yang berbeza-beza). Larutan penimbal bagi setiap pH dipipet sebanyak 10 ml dan diletakkan dalam tabung uji. Sebanyak 5 mg Silika Dioksida diisi ke dalam setiap tabung uji yang berbeza pHnya. Setiap larutan dalam tabung uji disonikasi bagi membebaskan kandungan sellularnya (Rajah 1). Selepas itu, 3 mg lisozim dan 1 mg tween 20 dimasukkan ke dalam setiap tabung uji dan dilarutkan menggunakan pengacau yang kemudiannya diuji menggunakan spektrometer UV-boleh nampak.



Rajah 1. Gambarajah skematik kaedah penyediaan teras/ rangka SiO_2

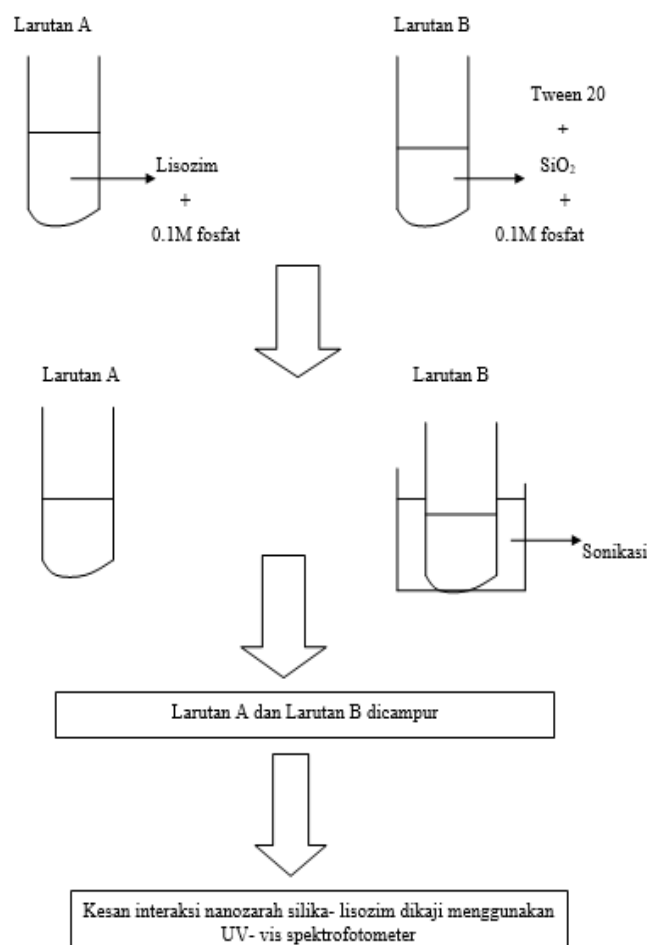
Sedia maklum, Silika Dioksida (SiO_2) mempunyai ikatan kovalen dan membentuk struktur jaringan (juga dikenali sebagai struktur kekisi). Ikatan kovalen adalah ikatan yang terhasil disebabkan oleh perkongsian elektron di antara dua atom yang memberi ikatan pasangan elektron atau antara atom dengan ikatan kovalen yang lain. Secara ringkasnya, kestabilan tarikan kepada tolakan yang terbentuk di antara atom apabila mereka berkongsi elektron dikenali sebagai ikatan kovalen. Ikatan kovalen melibatkan banyak tindakbalas termasuklah ikatan σ , ikatan π , ikatan logam- logam dan tindakbalas agnostik.

Manakala, lisozim mempunyai kumpulan karboksil yang mengandungi kelas rantai tepi (*side chain*) yang utama. Enam daripadanya mempunyai nilai pK yang diandaikan sebagai pengganggu. Dan selebihnya, mempunyai kumpulan yang mengalami perubahan persekitaran melalui tindakbalas dengan bahan atau penyekat (*inhibitor*) : Glu 35, Asp 52 dan Asp 101 bergabung dengan saccharide dan Asp 66 berada dalam rantai yang boleh bertindakbalas apabila *saccharide* terikat.

Sehubungan dengan itu, tempoh proses penyediaan larutan sehinggalah sampel menjalani pencirian perlulah dititiberatkan kerana ianya akan memberi kesan kepada kestabilan larutan. Di antara faktor- faktor yang boleh mempengaruhi kestabilan larutan termasuklah rantai molekul penyerapan yang menyebabkan kesan sterik di mana tindakbalas yang mempengaruhi bentuk dan kereaktifan ion dan molekul serta penggumpalan molekul disebabkan oleh kadar penyerapan molekul yang tidak terkawal [25].

2.2.2 Penjerapan Isozim ke atas SiO_2

Nisbah berat nanozarah SiO_2 dan lisozim yang digunakan adalah berbeza- beza (Jadual 1). Nilai nisbah SiO_2 tetap dikaji terlebih dahulu diikuti dengan nilai nisbah Lisozim. Nilai pH larutan penimbal yang digunakan adalah pH 7.8. Sebanyak 1 mg Tween 20 ditambah ke dalam setiap tabung uji yang mengandungi nisbah berat SiO_2 :Lisozim yang berbeza (Rajah 2). Larutan kemudiannya dikacau dan diempar (4000 rpm) selama 5 minit.



Rajah 2. Penyediaan larutan sebelum dikaji menggunakan UV- vis spektrofotometer

3. Keputusan dan Perbincangan

Penyerapan nanozarah SiO_2 terhadap lisozim boleh ditentukan dengan cara yang paling mudah iaitu melalui kajian spektrum serapan bahan tersebut sebagai fungsi panjang gelombang. Apabila foton terkena pada nanozarah SiO_2 , ia hanya akan menyerap foton tersebut jika tenaga foton tersebut berupaya mengujakan elektron valensi dari orbitalnya. Penyerapan tenaga foton tidak berlaku jika tenaga foton adalah lebih rendah dari tenaga yang boleh mengujakan elektron valensi tersebut. Disebabkan oleh fenomena ini, terdapat suatu peningkatan secara mendadak dalam spektrum serapan apabila tenaga foton sama dengan tenaga yang boleh mengujakan elektron valensi. Titik dimana nanozarah SiO_2 mula menyerap foton dikenali sebagai spektrum serapan luar (*absorption edge*).

Semua sebatian organik mampu menyerap sinaran elektromagnet kerana semuanya mengandungi elektron valensi yang boleh diujakan kepada aras tenaga yang tinggi. Maka penyerapan oleh elektron jenis ini dihadkan kepada kawasan uv ($\lambda < 180\text{nm}$). Pada peringkat ini, komponen atmosfera juga dapat melakukan penyerapan dengan baik. Kesukaran melakukan eksperimen dengan menggunakan uv adalah sukar. Akibatnya kebanyakan spektrofotometrik sebatian organik terlibat pada kawasan panjang gelombang lebih besar daripada 180nm. Penyerapan cahaya uv dan cahaya nampak dihadkan kepada sebilangan kumpulan berfungsi (dikenali sebagai kromofor) yang mengandungi elektron valensi yang secara relatifnya mempunyai tenaga pengujaan yang rendah.

Kromofor adalah kawasan dalam molekul dimana perbezaan tenaga di antara dua orbit molekul yang berbeza jatuh dalam kadar spektrum nampak. Cahaya nampak yang melanggar kromofor akhirnya akan diserap oleh elektron yang teruja dari peringkat bawah (*ground*) kepada peringkat ujaan (*excited*). Kromofor selalunya wujud dalam satu atau dua bentuk iaitu dalam sistem π konjugat dan logam kompleks. Peringkat tenaga yang diujakan oleh elektron di antara π orbital terhasil daripada siri- siri perubahan ikatan satu (*single*) atau ikatan ganda dua (*double*) selalunya dalam kumpulan aromatik.

Spektra elektronik bagi molekul organik poliatom mengandungi kromofor yang selalunya kompleks kerana berlakunya peralihan superposisi gegaran (*vibrational*) pada elektronik peralihan yang menghalau kepada spektra. Ia terhasil daripada gabungan siri- siri garisan pertindihan yang rumit, dan menghasilkan lingkaran penyerapan yang bersambung dan meluas. Dalam molekul orbit, π elektron adalah nyahlokal oleh proses konjugat, maka ianya melibatkan orbit yang mempunyai empat pusat atom atau lebih. Kesan nyahlokal ini adalah untuk merendahkan peringkat tenaga orbit π^* dan memberi ciri- ciri tenaga ikatan yang kuat.

Penyerapan maksimum diubah untuk memanjangkan panjang gelombang. Akibatnya, kebanyakan aplikasi spektroskopi penyerapan kepada sebatian organik adalah berasaskan peralihan neutron atau π elektron kepada peringkat pengujaan π^* kerana tenaga yang diperlukan untuk proses ini membawa puncak penyerapan kepada kawasan spektra (200nm- 700nm). Kedua- dua peralihan memerlukan kehadiran kumpulan berfungsi yang tidak tepu untuk membekalkan orbit π . Penyerapan molar bagi puncak penyerapan diperolehi hasil daripada gabungan bersama dalam peringkat pengujaan n. Peringkat tenaga π^* adalah paling rendah daripada apa yang dijumpai dan berada dalam kadar $10\text{-}100 \text{ liter cm}^{-1} \text{ mol}^{-1}$.

Perbezaan ciri- ciri di antara dua jenis penyerap dijumpai dalam kesan pelarut pada panjang gelombang puncak. Puncak yang timbul daripada peralihan n- π^* adalah secara amnya berganjak kepada panjang gelombang yang pendek (*hypsochromic* atau *blueshift*), apabila kekutuban pelarut meningkat. Kesan *hypsochromic* terhasil daripada peningkatan gabungan pasangan elektron tidak terikat yang mana merendahkan tenaga orbit n. Disini tenaga orbit n direndahkan oleh jumlah yang hampir sama dengan tenaga ikatan hidrogen. Apabila peralihan n- π^* berlaku, elektron tunggal yang

kekal adalah tidak memadai untuk mengekalkan ikatan hidrogen maka tenaga n, peringkat pengujian π^* tidak dipengaruhi oleh tindakbalas pelarut jenis ini.

Penyinaran sampel dalam kawasan uv dan sinaran nampak menyebabkan perpindahan elektronik yang terletak pada petala paling luar (*electron valens*). Jika sampel terdiri daripada atom atau molekul dalam peringkat gas, spektrum penyerapan biasanya terdiri daripada siri- siri penyerapan yang tinggi dan baik berdasarkan kepada ketersediaan perpindahan elektron yang dibenarkan. Secara perbandingannya spektra ion atau molekul dalam larutan terlibat dengan superposisi getaran dan kadang- kadang tenaga putaran bertukar disebabkan perpindahan elektronik. Kepelbagaian garisan yang ditunjukkan adalah hasil daripada tarikan dalam molekul yang berlaku di antara molekul atau ion yang rapat dalam medium tindakbalas.

Penyerapan sinaran elektromagnet oleh spesies M boleh digambarkan sebagai dua langkah proses yang berbalik iaitu:



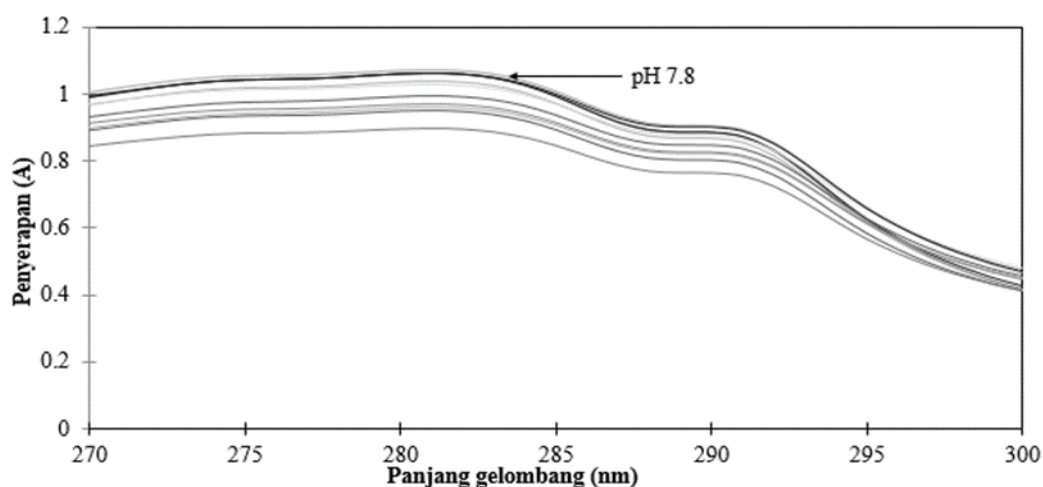
M^* adalah atom atau zarah molekul dalam peringkat teruja hasil daripada penyerapan photon (hv). Jangka hayat peringkat pengujian ini secara ringkasnya adalah (10^{-8} ke 10^{-9}), ianya wujud hasil daripada penyingkiran beberapa proses penyantaian.



Penyantaian melibatkan penukaran tenaga pengujian kepada haba

3.1 pH

Rajah 3 mempamerkan graf penyerapan melawan panjang gelombang bagi nilai pH 7.0 hingga 8.0. Titik isoelektrik bagi telur putih lisozim adalah 11.1 seperti yang dinyatakan dalam kajian yang dilakukan oleh Marijin *et al.*, (2006)[11], mengenai penyerapan lisozim pada permukaan hidrofilik silika dalam pH yang berbeza. Nilai pH bergantung kepada tindakbalas protein dan bahan penyerap serta tindakbalas antara penyerapan molekul- molekul protein [16]. Diperhatikan lisozim kadar penyerapan awalnya meningkat dengan kepekatan (Jadual 1).



Rajah 3. Graf penyerapan melawan panjang gelombang bagi nilai pH 7.0 hingga 8.0 (dibaca dari atas ke bawah kecuali pH 7.8)

Jadual 1

Nisbah berat SiO₂- Lisozim yang digunakan

Nisbah berat SiO ₂ : Lisozim (SiO ₂ tetap)		Nisbah berat SiO ₂ : Lisozim (Lisozim tetap)	
SiO ₂	Lisozim	SiO ₂	Lisozim
1	1	1	1
1	5	5	1
1	10	10	1
1	15	15	1
1	20	20	1

Protein pada titik isoelektrik tidak mempunyai sebarang cas dan tolakan elektrostatik di antara molekul penjerap adalah minimum. Protein pada titik ini boleh memperoleh jarak yang dekat dengan permukaan serapan berbanding dengan protein yang membawa cas. Alasan lain ialah pada kawasan isoelektrik, protein mempunyai kestabilan struktur yang tinggi jadi kecenderungan untuk tersebar pada permukaan adalah kecil untuk lisozim, penyerapan paling tinggi adalah pada nilai pH 7.8 yang mana terletak di bawah titik isoelektrik telur putih-lisozim (Jadual 2).

Pada kadar pH ini permukaan silika dioksida adalah bercas negatif (hidrofilik) dan lisozim adalah bercas positif (hidrofobik). Kesesuaian memilih pH 7.0- pH 8.0 adalah berdasarkan jenis larutan penimbal yang digunakan iaitu larutan penimbal fosfat dan dinyatakan lisozim menjerap paling maksimum dalam larutan alkali seperti yang dinyatakan dalam kajian [17]. Larutan penimbal adalah larutan yang rintang kepada perubahan pH apabila ion hidroksida (OH⁻) dan ion hidronium (H₃O⁺) ditambah. Penimbal menyebabkan larutan rintang terhadap sebarang perubahan dalam pH apabila asid kuat atau alkali ditambah. Ini bermaksud penimbal biasanya disediakan daripada konjugat asid-alkali: asid lemah dan konjugat alkalinya dan alkali lemah dan asid konjugatnya.

Jadual 2

Nilai puncak yang diperolehi bagi parameter pH

Nilai pH	Isipadu NaoH yang ditambah kepada larutan KH ₂ PO ₄ (ml)	Puncak (nm)
7.0	50.0	280.91
7.1	77.5	280.96
7.2	81.7	280.92
7.3	84.2	280.93
7.4	87.6	280.87
7.5	88.9	280.89
7.6	89.0	280.93
7.7	91.5	280.95
7.8	91.7	280.98
7.9	93.2	280.93
8.0	95.8	280.96

Dalam kajian ini, larutan penimbal fosfat disediakan dengan kepekatan 0.1M KH₂PO₄ dengan pHnya diubah menggunakan larutan akues NaOH. Larutan kosong yang digunakan ialah air ternyahion. Penjerapan di bawah atau pada titik isoelektrik adalah sangat baik tetapi di atas titik isoelektrik penjerapan adalah tidak begitu memuaskan. Di atas titik isoelektrik, protein semakin menghampiri permukaan, protein perlu mengatasi halangan elektrostatik. Maka perbezaan yang kecil dalam keadaan pengukuran memberi pengaruh yang besar pada kadar penjerapan. Dianggapkan penghasilan kadar penjerapan yang sedikit pada data eksperimen disebabkan oleh perbezaan yang kecil pada permukaan silika dioksida. Lisozim adalah protein yang rintang [18]. Ini bermaksud bahawa secara strukturnya ia adalah protein yang stabil dan tidak menyerap pada permukaan hidrofilik di bawah keadaan daya tolakan elektrostatik.

3.2 Nisbah Berat SiO₂: Lisozim (SiO₂ Tetap)

Nisbah berat di antara SiO₂: Lisozim adalah berbeza (Jadual 3). Berat (mg) SiO₂ yang tetap telah memberi kesan terhadap kadar penjerapan lisozim. Nisbah berat di antara SiO₂: Lisozim ditindakbalaskan dalam larutan penimbal (pH 7.8) yang berisipadu 10ml setiap satunya. Dalam eksperimen mengkaji parameter ini, kita boleh kaitkan dengan diameter SiO₂ ialah 7nm dan diameter lisozim adalah 41.4 nm dengan ukuran dimensinya 4.6x 3.0x 3.0 nm.

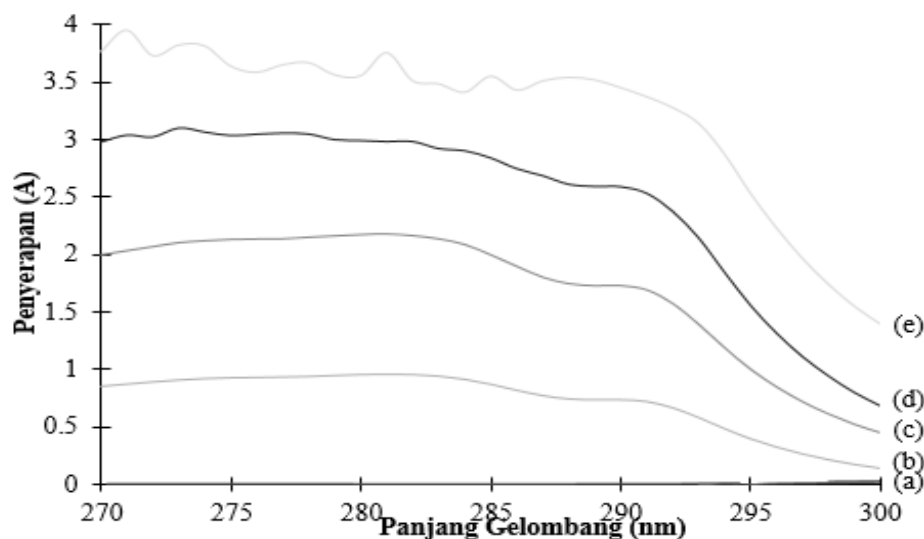
Jadual 3

Nilai puncak yang diperolehi bagi nisbah berat SiO₂: Lisozim (SiO₂ tetap)

SiO ₂ (mg)	Lisozim (mg)	Puncak (nm)
1	1	Tiada
1	5	285.99
1	10	285.86
1	15	289.10
1	20	289.98

Dapat dilihat, tapak bagi penjerapan lisozim semakin berkurang apabila nilai berat lisozim semakin bertambah. Larutan penimbal yang digunakan adalah berpH 7.8 yang diperolehi daripada eksperimen mengkaji pH sebelum ini. Permukaan silika yang bercas negatif (hidrofilik) dan lisozim yang bercas positif (hidrofobik) menggalakkan lagi kadar penyerapan [19]. Pada kadar nisbah SiO₂: Lisozim 1:1 didapati tiada bacaan panjang gelombang yang didapati kerana kadar penyerapan adalah tetap .

Pada kadar nisbah SiO₂: Lisozim 1:5, 1:10 didapati terdapat perubahan bacaan panjang gelombang (Rajah 4). Lisozim yang bercas positif semakain bertindak balas dengan SiO₂ yang bercas negatif dan juga ia bertindak balas dengan lebih lisozim (positif) yang tidak dapat menjerap pada permukaan SiO₂, berlakunya tolakan elektrostatik [20]. Akibat daripada diameter SiO₂ yang lebih kecil daripada lisozim menyebabkan banyak lisozim tidak dapat dijerap. Ini berlarutan pada nisbah SiO₂: Lisozim 1:15, 1:20. SiO₂ tidak dapat lagi menjerap dan larutan dikatakan telah tepu akibat lisozim yang banyak. Kita boleh membuat andaian bahawa lisozim membentuk penjerapan multi-lapisan pada permukaan silika dioksida dan membentuk gumpalan pada permukaan silika dioksida.



Rajah 4. Graf penyerapan melawannya panjang gelombang bagi nisbah berat SiO₂: Lisozim (SiO₂ tetap) (a) 1:1 (b) 1:5 (c) 1:10 (d) 1:15 (e) 1:20

Apabila nanozarah SiO_2 mengalami berat (miligram) yang semakin berkurang, struktur elektroniknya akan terganggu dan mengakibatkan pelebaran jurang tenaga dan anjakan serapan tepi ke panjang gelombang yang lebih pendek. Oleh itu, bacaan panjang gelombang yang diperolehi adalah semakin berkurang [21].

3.3 Nisbah Berat SiO_2 : Lisozim (Lisozim Tetap)

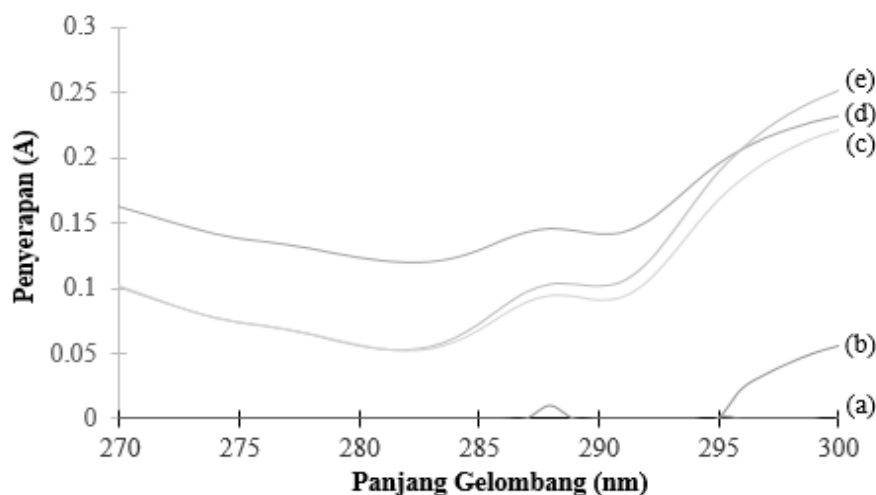
Bagi eksperimen SiO_2 : Lisozim dengan nilai lisozim adalah tetap (Jadual 4), nisbah berat di antara SiO_2 : Lisozim yang berbeza ditindakbalaskan dalam larutan penimbal (pH 7.8) yang berisipadu 10ml setiap satunya.

Jadual 4

Nilai puncak yang diperolehi bagi nisbah berat SiO_2 : Lisozim (Lisozim tetap)

SiO_2 (mg)	Lisozim (mg)	Puncak (nm)
1	1	Tiada
5	1	287.16
10	1	287.38
15	1	288.99
20	1	288.72

Permukaan penyerapan yang semakin banyak memberi kelebihan kepada lisozim untuk menyerap dan membentuk ikatan dengan SiO_2 (tapak penyerapan). Pada nilai Lisozim: SiO_2 1:1 didapati tiada bacaan panjang gelombang yang diperolehi kerana kadar penyerapan berkadar langsung dengan kepekatan (Rajah 5). Pada nilai Lisozim: SiO_2 1:5, 1:10, 1:15, 1:20 terdapat perubahan panjang gelombang diperolehi tetapi pada kadar penyerapan yang sangat rendah [22]. Ini menunjukkan penyerapan lisozim adalah malar terhadap SiO_2 . Lisozim tidak lagi melakukan penyerapan dan larutan dikatakan telah tepu hasil daripada kadar SiO_2 yang semakin banyak. Ini juga bermaksud tiada lisozim yang berkumpul pada permukaan silika dioksida bagi membentuk molekul penyerap.



Rajah 5. Graf penyerapan melawan panjang gelombang bagi nisbah berat SiO_2 : Lisozim (Lisozim tetap) (a) 1:1 (b) 1:5 (c) 1:10 (d) 1:15 (e) 1:20

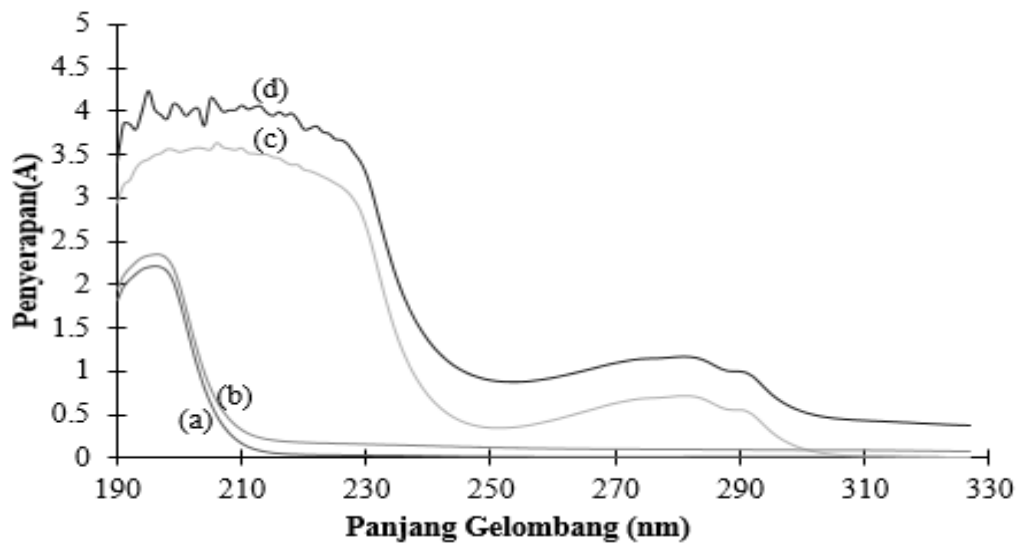
Apabila nanozarah SiO_2 yang mengalami berat (miligram) yang semakin bertambah. Struktur elektroniknya tidak terganggu tetapi mengakibatkan pelebaran jurang tenaga dan anjakan serapan tepi ke panjang gelombang yang lebih besar dan akhirnya menurun kembali. Oleh itu, bacaan panjang gelombang yang diperolehi adalah besar dan semakin mengecil.

Selain itu, kepelbagaian penyerapan melihatkan perbezaan yang ketara di antara semua parameter yang dikaji (Jadual 5). Apabila hanya terdapat larutan penimbal dan lizozim sahaja, panjang gelombang yang diperolehi adalah besar berbanding dengan larutan penimbal, SiO_2 dan lizozim (Rajah 6). Dapat dirumuskan daripada ketiga-tiga bahan tersebut, lizozim memberikan panjang gelombang yang besar dan membuktikan lizozim adalah rintang atau stabil terhadap larutan penimbal fosfat.

Jadual 5

Nilai puncak yang diperolehi bagi kepelbagaian penyerapan yang berbeza

Jenis Penjerapan	Puncak (nm)
Larutan Penimbal (7.8)	196.05
Larutan Penimbal (7.8) dan SiO_2 (5mg)	196.49
Larutan Penimbal (7.8) dan Lizozim (3mg)	281.21
Larutan Penimbal(7.8), SiO_2 (5mg) dan Lizozim (3mg)	280.92



Rajah 6. Graf penyerapan melawan panjang gelombang bagi kepelbagaian penyerapan yang berbeza (a) Larutan penimbal (b) Larutan penimbal dan SiO_2 (c) Larutan penimbal, SiO_2 dan lizozim (d) Larutan penimbal dan lizozim

3.4 Interaksi antara SiO_2 dan Lizozim dalam Larutan Penimbal

Nanozarah SiO_2 mempunyai luas permukaan yang besar berbanding isipadu. Ini membenarkan lizozim menjerap ke atas permukaannya. Pembauran zarah dalam cecair ditentang oleh kelikatan larutan. Jadi pergerakan zarah yang tersebar melalui cecair adalah perlahan apabila kelikatan bertambah. Kelikatan yang diperolehi dalam eksperimen ini yang dianalisis menggunakan *Zetasizer* adalah 0.8872 cP (<1) dan menunjukkan larutan adalah kurang likat dan pembauran berlaku dalam keadaan yang malar. Dalam eksperimen ini, 5 mg SiO_2 dan 3 mg lizozim digunakan. Jadi terdapat

lebih banyak SiO_2 di permukaan dan meningkatkan daya tolakkan elektrostatis di antara SiO_2 - SiO_2 dan tarikan di antara SiO_2 - lisozim.

Daripada graf peratus isipadu (%) melawan diameter (nm), penyerapan dilakukan hampir 40% daripada luas permukaan. Seperti yang diketahui, salah satu faktor yang mempengaruhi kadar penyerapan adalah tarikan permukaan antara dua bahan. Pada satu takat wujudnya keseimbangan tarikan di antara dua permukaan. Larutan dikatakan tepu disebabkan tenaga kinetik lisozim semakin perlahan. Dengan kata lain, penyerapan pada permukaan semakin lengkap dan penembusan lisozim terhadap permukaan SiO_2 semakin kompleks dan sukar.

Purata saiz nanozarah SiO_2 yang kecil membolehkan ia mempunyai luas permukaan yang besar (Rajah 7). Apabila dibandingkan dari segi diameter di antara SiO_2 dan lisozim, SiO_2 mempunyai diameter yang besar (78.01 nm) dan lisozim mempunyai diameter yang kecil (99.5nm), keadaan ini membolehkan lisozim melaluinya tanpa sebarang halangan (Rajah 8). Jadi pekali pembauran, D yang diperolehi bagi lisozim ($4.942 \times 10^{-12} \text{ cm}^2/\text{s}$) adalah besar berbanding SiO_2 ($6.304 \times 10^{-12} \text{ cm}^2/\text{s}$) dan lebih banyak lisozim yang boleh merentasinya.

Pekali pembauran adalah berkadar songsang dengan saiz zarah. Semakin kecil zarah, semakin besar kadar pembaurannya kerana zarah yang kecil bergerak dengan pantas dan menyebabkan pembauran berlaku dengan kadar yang cepat (Jadual 6). Secara teorinya, nanozarah SiO_2 sepatutnya mempunyai nilai pekali pembauran yang besar kerana saiznya yang kecil tetapi dalam eksperimen ini didapati pekali pembauran untuk lisozim adalah lebih besar berbanding dengan SiO_2 . Keadaan ini berlaku kerana diameter SiO_2 yang besar membenarkan lisozim yang berdiameter kecil untuk melaluinya.

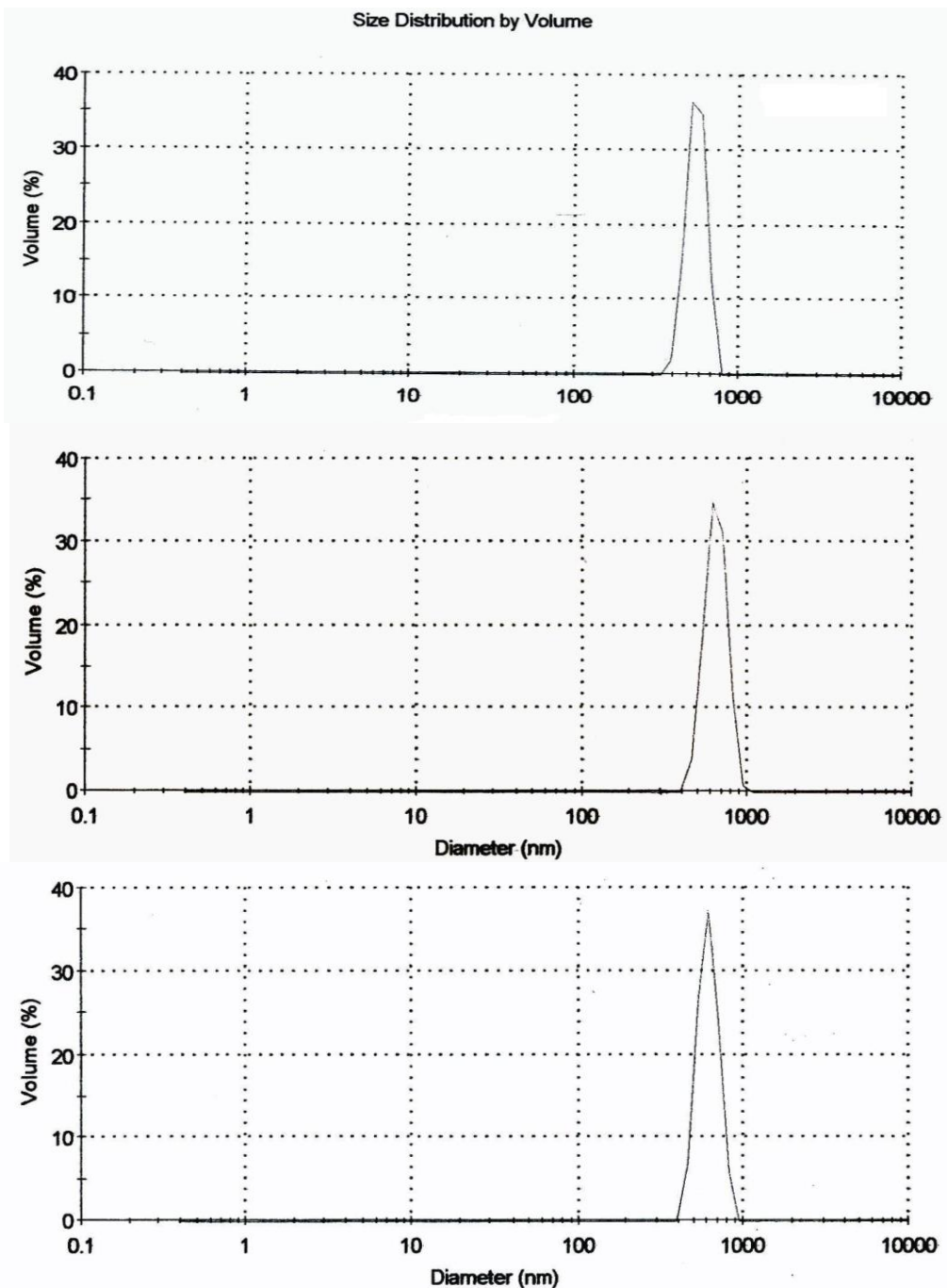
Eksperimen sebelum ini yang mengkaji kepekatan larutan, didapati lisozim mempunyai puncak panjang gelombang yang tinggi jika dibandingkan dengan SiO_2 . Dalam eksperimen serakan cahaya ini telah terbukti sekali lagi lisozim sememangnya mempunyai nilai puncak panjang gelombang yang tinggi akibat daripada pelebaran jurang tenaga dan anjakan serapan tepi ke panjang gelombang yang lebih besar.

Apabila ketiga- tiga bahan dicampurkan berlaku tindak balas di antara SiO_2 bercas negatif (hidrofilik) dan lisozim bercas positif (hidrofobik). Perbezaan cas pada permukaan membolehkan kedua- duanya melakukan proses penyerapan. Ditambah pula dengan luas permukaan nanozarah SiO_2 boleh memberikan kadar penyerapan yang besar. Pekali pembauran yang diperolehi adalah $5.3815 \times 10^{-12} \text{ cm}^2/\text{s}$ (Jadual 7). Apabila dibandingkan di antara ketiga- tiga pekali pembauran yang diperolehi, lisozim memberikan pekali pembauran yang besar. Jadi dapat disimpulkan, berlakunya penyerapan antara lisozim dan permukaan SiO_2 .

Pembauran adalah pergerakan zarah secara spontan daripada kawasan yang berkepekatan tinggi kepada kawasan yang berkepekatan rendah sama ada dalam cecair atau gas. Proses pembauran adalah proses spontan yang disebabkan oleh pergerakan zarah yang rawak. Apabila penyerapan semakin meningkat, nilai entropi juga meningkat manakala tenaga bebas Gibbs semakin berkurang.

Hukum Fick bagi pergerakan pembauran bahan per unit luas adalah berkadar langsung dengan darjah kepekatan bahan. Kemalaran peredaran juga dikenali sebagai pemalar pembauran, D . Ia bergantung kepada spesies penyerapan dan bahan yang melaluinya, di mana proses pembauran berlaku.

Mekanisma pembauran ditakrifkan sebagai akibat daripada pergerakan rawak molekul (gerakkan *brown*) pada sesuatu kawasan. Ia juga dipengaruhi oleh teori kinetik dan purata kelajuan zarah jika tiada luar dikenakan ke atasnya. Pergerakan antara molekul- molekul adalah bebas. Gabungan di antara serakan cahaya dinamik dan serakan cahaya elektroforetik membolehkan pengukuran pembauran menjadi tepat dan mudah.

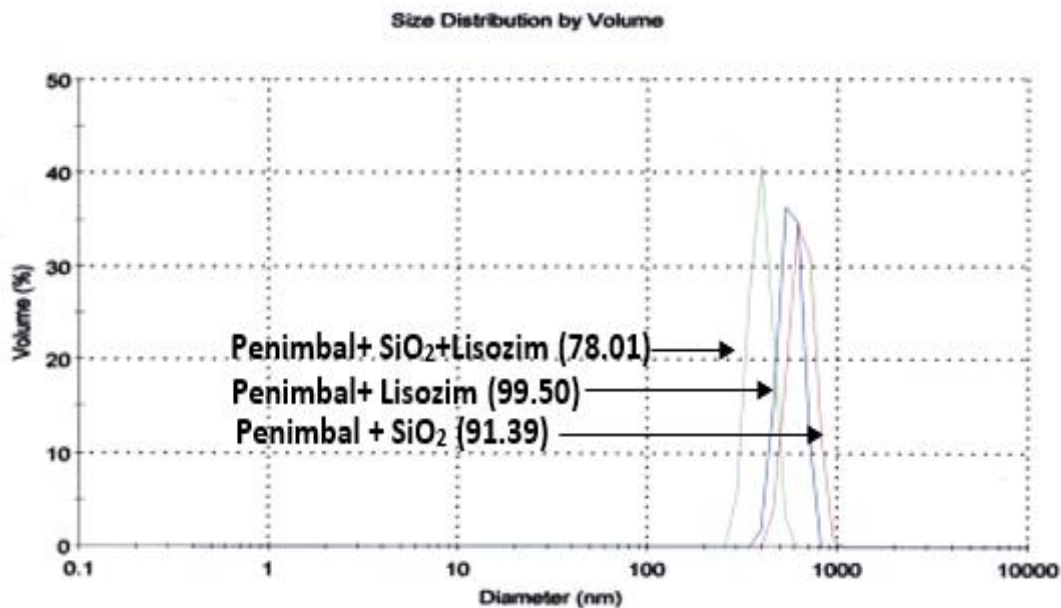


Rajah 7. Isipadu (%) melawan diameter (nm) (a) Penimbal+SiO₂ (b) Penimbal+lisozim (c) Penimbal+ SiO₂+Lisozim

Serakkan cahaya elektroforetik sebenarnya adalah berasaskan kepada serakkan cahaya dinamik. Anjakan frekuensi dan anjakan fasa alur tuju laser bergantung kepada pergerakan serakkan zarah. Dalam serakkan cahaya dinamik, pergerakan *brown* yang menyebabkan pergerakan zarah. Manakala dalam serakkan cahaya elektroforetik, ayunan medan elektrik yang menyebabkan pergerakan zarah. Proses yang berlaku dikenali sebagai elektroforesis. Ianya berlaku akibat daripada zarah yang terserak dalam larutan mempunyai cas elektrik pada permukaannya. Medan elektrik mengenakan daya elektrostatik *coulomb* pada permukaan zarah.

Daya lain yang terlibat adalah daya elektrostatik. Ia terbit daripada teori lapisan gandaan yang mana semua permukaan bercas dalam larutan dilapisi dengan lapisan pembauran. Lapisan

pembauran mempunyai nilai cas yang mutlak tetapi casnya adalah bertentangan dengan cas permukaan. Medan elektrik akan mengaruhkan daya pada lapisan pembauran dan juga cas pada permukaan.



Rajah 8. Isipadu (%) melawan diameter (nm) bagi ketiga – tiga bahan

Jadual 6

Keputusan eksperimen menggunakan Zetasizer

Parameter	Penimbal (7.8) + SiO ₂ (5mg)	Penimbal (7.8) + Lisozim (3mg)	Penimbal (7.8) + SiO ₂ + Lisozim
Purata saiz -Z (nm)	878.4	272.2	1654
Puncak	567.8	651.2	617.8
Diameter (nm)	78.01	99.5	91.39
Suhu (K)	298	298	298
Kelikatan (cP)	0.8872	0.8872	0.8872
% Isipadu	100	100	100
Kadar bilangan	32	44	304

Jadual 7

Nilai pekali pembauran bagi ketiga- tiga bahan

Sampel	Penimbal (7.8) + SiO ₂ (5mg)	Penimbal (7.8) + Lisozim (3mg)	Penimbal (7.8) + SiO ₂ + Lisozim
Pembauran (cm ² /s)	6.304 x 10 ⁻¹²	4.942 x 10 ⁻¹²	5.3815 x 10 ⁻¹²

4. Kesimpulan

Interaksi nanozarah SiO₂-Lisozim dalam larutan penimbal membuktikan bahawa wujudnya kestabilan antara SiO₂ dengan lisozim. Ini dapat dilihat daripada kesan penjerapan lisozim terhadap permukaan SiO₂. Peranan teras adalah menyediakan nukleus bagi pembentukan kestabilan hidrofilik polimerik untuk penyerapan fizikal. Manakala rangka polimerik adalah untuk menyediakan rangkaian hidrofilik untuk penjerapan protein. Permukaan SiO₂ yang bersifat hidrofilik (negatif) membolehkannya bertindak balas terhadap protein yang bersifat hidrofobik (positif).

Terdapat beberapa faktor yang mempengaruhi penyerapan protein serta tarikan protein terhadap sesuatu permukaan seperti kestabilan struktur protein, kekuatan ionik, pH larutan serta sifat hidrofobik permukaan penyerapan. Ini menunjukkan penyusunan semula molekul protein dan kekutuban permukaan protein adalah penyumbang terbesar terhadap proses penyerapan.

- i. Dalam eksperimen mengkaji parameter pH, panjang gelombang yang paling besar diperolehi pada pH 7.8. Pencirian menggunakan UV-vis menyebabkan berlakunya proses pengujian oleh elektron valensi dari orbital nanozarah SiO_2 . Oleh itu, terdapat peningkatan dalam spektrum serapan apabila tenaga foton sama dengan tenaga yang boleh mengujakan electron valensi dalam nanozarah SiO_2 . Titik di mana nanozarah SiO_2 mula menyerap foton dikenali sebagai spektrum serapan luar.
- ii. Bagi nisbah SiO_2 : Liozime (SiO_2 tetap), akibat daripada nilai SiO_2 yang malar, bacaan panjang gelombang yang diperolehi semakin berkurang disebabkan struktur elektroniknya terganggu dan mengakibatkan pelebaran jurang tenaga dan anjakan serapan tepi spektrum ke panjang gelombang yang lebih pendek.
- iii. Bagi nisbah SiO_2 : Liozime (lizoime tetap), akibat daripada nilai SiO_2 yang semakin bertambah bacaan panjang gelombang yang diperolehi semakin besar dan akhirnya mengecil. Dalam situasi ini, struktur elektronik nanozarah SiO_2 tidak terganggu tetapi proses pengujian elektron valensi oleh tenaga foton tetap berlaku dan mengakibatkan pelebaran jurang tenaga dan anjakan serapan tepi ke panjang gelombang yang lebih besar dan akhirnya menurun kembali.
- iv. Penggunaan kaedah serakan cahaya dalam menentukan jejari, saiz dan pembauran dalam larutan dapat diaplikasikan dalam interaksi nanozarah SiO_2 dan liozime. Zarah yang bersaiz nano adalah sangat sesuai digunakan dalam semua proses sama ada penjerapan, pempolimeran, mikroemulsi dan banyak lagi. Nanozarah SiO_2 menyediakan tapak yang luas untuk liozime melakukan penjerapan. Hasil eksperimen menunjukkan pembauran bagi liozime adalah besar berbanding dengan SiO_2 . Jadi liozime boleh melakukan proses penjerapan tanpa sebarang halangan. Perbezaan permukaan cas antara kedua-duanya juga mempercepatkan tindakbalas.

Penghargaan

Penulis ingin mengucapkan setinggi penghargaan kepada Fakulti Sains Gunaan dan Teknologi, Universiti Tun Hussein Onn Malaysia dan Fakulti Sains dan Teknologi, Universiti Kebangsaan Malaysia untuk kemudahan yang disediakan bagi membolehkan penyelidikan ini dilakukan dengan jayanya.

Rujukan

- [1] Steadman, Bryan L., Karen C. Thompson, C. Russell Middaugh, Ken Matsuno, Susan Vrona, Erlinda Q. Lawson, and Randolph V. Lewis. "The effects of surface adsorption on the thermal stability of proteins." *Biotechnology and bioengineering* 40, no. 1 (1992): 8-15.
<https://doi.org/10.1002/bit.260400103>
- [2] Legrand, Andre Pierre, and Christiane Senemaud, eds. *Nanostructured silicon-based powders and composites*. CRC Press, 2002.
<https://doi.org/10.4324/9780203222294>
- [3] Perriman, A. W., and J. W. White. "Kinetics of adsorption of lysozyme at the air-water interface and the role of protein charge." *Physica B: Condensed Matter* 385 (2006): 716-718.
<https://doi.org/10.1016/j.physb.2006.05.369>

- [4] Cai, Cuifang, Udo Bakowsky, Erik Rytting, Andreas K. Schaper, and Thomas Kissel. "Charged nanoparticles as protein delivery systems: a feasibility study using lysozyme as model protein." *European journal of pharmaceuticals and biopharmaceutics* 69, no. 1 (2008): 31-42.
<https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2007.10.005>
- [5] Romanini, Diana, Mauricio Braia, Rodrigo Giatte Angarten, Watson Loh, and Guillermo Picó. "Interaction of lysozyme with negatively charged flexible chain polymers." *Journal of Chromatography B* 857, no. 1 (2007): 25-31.
<https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2007.06.025>
- [6] Rojas, Edwin E. Garcia, Jane S. dos Reis Coimbra, Luis A. Minim, Sérgio H. Saraiva, and César A. Sodrè da Silva. "Hydrophobic interaction adsorption of hen egg white proteins albumin, conalbumin, and lysozyme." *Journal of Chromatography B* 840, no. 2 (2006): 85-93.
<https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2006.04.033>
- [7] Frare, Erica, Maria F. Mossuto, Patrizia Polverino de Laureto, Mireille Dumoulin, Christopher M. Dobson, and Angelo Fontana. "Identification of the core structure of lysozyme amyloid fibrils by proteolysis." *Journal of molecular biology* 361, no. 3 (2006): 551-561.
<https://doi.org/10.1016/j.jmb.2006.06.055>
- [8] Shirahama, Hiroyuki, Johannes Lyklema, and Willem Norde. "Comparative protein adsorption in model systems." *Journal of colloid and interface science* 139, no. 1 (1990): 177-187.
[https://doi.org/10.1016/0021-9797\(90\)90455-W](https://doi.org/10.1016/0021-9797(90)90455-W)
- [9] Dong, Aichun, Steven J. Prestrelski, S. Dean Allison, and John F. Carpenter. "Infrared spectroscopic studies of lyophilization-and temperature-induced protein aggregation." *Journal of pharmaceutical sciences* 84, no. 4 (1995): 415-424.
<https://doi.org/10.1002/jps.2600840407>
- [10] van der Veen, Marijn, Willem Norde, and Martien Cohen Stuart. "Electrostatic interactions in protein adsorption probed by comparing lysozyme and succinylated lysozyme." *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 35, no. 1 (2004): 33-40.
<https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2004.02.005>
- [11] van der Veen, Marijn, Martien Cohen Stuart, and Willem Norde. "Spreading of proteins and its effect on adsorption and desorption kinetics." *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 54, no. 2 (2007): 136-142.
<https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2006.08.017>
- [12] Marolia, Kamalrookh Z., and Stanislaus F. D'Souza. "A simple technique for the immobilization of lysozyme by cross-linking of hen egg white foam." *Journal of biochemical and biophysical methods* 26, no. 2-3 (1993): 143-147.
[https://doi.org/10.1016/0165-022X\(93\)90044-O](https://doi.org/10.1016/0165-022X(93)90044-O)
- [13] Kotz, John, Paul Treichel, and John Townsend. *Chemistry and chemical reactivity*. Nelson Education, 2011.
- [14] Sarkar, Deepa, and D. K. Chattoraj. "Excess adsorption of lysozyme and water at solid-liquid interfaces." *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 2, no. 4 (1994): 411-417.
- [15] Lu, Jian R., Xiubo Zhao, and Mohammed Yaseen. "Protein adsorption studied by neutron reflection." *Current Opinion in Colloid & Interface Science* 12, no. 1 (2007): 9-16.
<https://doi.org/10.1016/j.cocis.2007.02.001>
- [16] Rezwani, Kurosch, Lorenz P. Meier, and Ludwig J. Gauckler. "A prediction method for the isoelectric point of binary protein mixtures of bovine serum albumin and lysozyme adsorbed on colloidal titania and alumina particles." *Langmuir* 21, no. 8 (2005): 3493-3497.
<https://doi.org/10.1021/la047288g>
- [17] Osserman, Elliott, ed. *Lysozyme*. Elsevier, 2012.
- [18] Daly, Susan M., Todd M. Przybycien, and Robert D. Tilton. "Aggregation of lysozyme and of poly (ethylene glycol)-modified lysozyme after adsorption to silica." *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 57, no. 1 (2007): 81-88.
<https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2007.01.007>
- [19] Coradin, Thibaud, Aurélie Coupé, and Jacques Livage. "Interactions of bovine serum albumin and lysozyme with sodium silicate solutions." *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 29, no. 2-3 (2003): 189-196.
[https://doi.org/10.1016/S0927-7765\(02\)00208-4](https://doi.org/10.1016/S0927-7765(02)00208-4)
- [20] Stefani, Massimo, and Christopher M. Dobson. "Protein aggregation and aggregate toxicity: new insights into protein folding, misfolding diseases and biological evolution." *Journal of molecular medicine* 81, no. 11 (2003): 678-699.
<https://doi.org/10.1007/s00109-003-0464-5>
- [21] Seager, Spencer L., and Michael R. Slabaugh. *Introductory Chemistry for Today*. Cengage Learning, 2013.
- [22] Odabaşı, Mehmet, Ridvan Say, and Adil Denizli. "Molecular imprinted particles for lysozyme purification." *Materials Science and Engineering: C* 27, no. 1 (2007): 90-99.
<https://doi.org/10.1016/j.msec.2006.03.002>

-
- [23] Böhmert, Linda, Linn Voß, Valerie Stock, Albert Braeuning, Alfonso Lampen, and Holger Sieg. "Isolation methods for particle protein corona complexes from protein-rich matrices." *Nanoscale Advances* 2, no. 2 (2020): 563-582. <https://doi.org/10.1039/C9NA00537D>
- [24] Vlasceanu, George M., Lamaru Victor, Hodorogea Maricica, Tudor Raluca, Ologeanu Vlad, Irina Gheorghe, Alexandra Bolocan, Alexandru M. Grumezescu, and Alina M. Holban. "Nanostructures for cancer therapy: From targeting to selective toxicology." In *Nanostructures for Cancer Therapy*, pp. 831-847. Elsevier, 2017. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-46144-3.00030-1>
- [25] Wiśniewska, Małgorzata, Konrad Terpiłowski, Stanisław Chibowski, Teresa Urban, Vladimir I. Zarko, and Vladimir M. Gun'ko. "Effect of solution pH on the stability of mixed silica-alumina suspension in the presence of polyacrylic acid (PAA) with different molecular weights." *Central European Journal of Chemistry* 11, no. 1 (2013): 101-110. <https://doi.org/10.2478/s11532-012-0136-9>