

## Nanobunga Hibrid Lektin sebagai Pembawa *Novel* untuk Pemegunan Glikoenzim (Lectin Hybrid Nanoflowers as Novel Carrier for Glycoenzyme Immobilisation)

WAN NURAZRA MARSYA WAN AHMAD<sup>1</sup>, NOR NADIA SAAD<sup>1</sup>, NUR NABILAH SHAHIDAN<sup>2</sup> & MUHAMMAD ASHRAF SHAHIDAN<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>Jabatan Sains Biologi dan Bioteknologi, Fakulti Sains dan Teknologi, Universiti Kebangsaan Malaysia, 43600 UKM Bangi, Selangor, Malaysia

<sup>2</sup>Jabatan Teknologi Tenaga, Mineral dan Bahan Fakulti Biokejuruteraan dan Teknologi, Universiti Malaysia Kelantan, Kampus Jeli, 17600 Jeli, Kelantan, Malaysia

Diserahkan: 29 April 2024/Diterima: 19 Ogos 2024

### ABSTRAK

Interaksi khusus antara concanavalin A (Con A), sejenis lektin daripada tumbuhan *jackbean*, dengan teras manosa pada glikan-N membolehkannya digunakan untuk pemegunan glikoenzim. Dalam kajian ini, nanobunga hibrid Con A- CuSO<sub>4</sub> (CCHN) disediakan sebagai pembawa *novel* untuk pemegunan peroksidase lobak putih (HRP), glikoenzim yang digunakan secara meluas dalam aplikasi bioanalitikal. Morfologi CCHN yang disediakan dicerap menggunakan mikroskop elektron pengimbasan pancaran medan (FESEM) menunjukkan mikrostruktur persis-bunga dengan saiz purata diameter 51.5 µm serta saiz kelopak bunga yang luas sekitar 2 µm. Seterusnya, pengoptimuman pemegunan HRP pada CCHN dilakukan menggunakan format tiub Eppendorf dan plat mikro menunjukkan bacaan penyerapan A<sub>450</sub> tertinggi pada campuran 100 µg/mL HRP dan 10 µg/mL CCHN untuk kedua-dua format. Aktiviti HRP terpegun pada CCHN yang diukur menggunakan format tiub Eppendorf (A<sub>450</sub> = 1.58) adalah dua kali ganda lebih tinggi berbanding format plat mikro (A<sub>450</sub> = 0.76) dan dipilih untuk kajian seterusnya. Bacaan A<sub>280</sub> untuk setiap supernatan yang diperolehi selepas pengemparan dalam langkah pembasuhan yang diulang sebanyak empat kali pula didapati amat rendah menunjukkan HRP terpegun dengan kuat pada CCHN dan tiada kebocoran enzim pada larutan. Ujian penjana semula menunjukkan HRP terpegun boleh ditanggalkan daripada CCHN dengan sekali pembasuhan menggunakan gula perencat metil α-manosa pada kepekatan 0.1 M. Selain itu, ujian kebolehulangan turut dilakukan menggunakan tiga kelompok CCHN yang berbeza kerana tiada perbezaan signifikan pada bacaan A<sub>450</sub> menunjukkan kebolehulangan yang baik untuk pemegunan HRP. Keputusan kajian ini menunjukkan CCHN yang dihasilkan mempunyai potensi yang tinggi untuk digunakan sebagai pembawa untuk pemegunan glikoenzim secara mudah, tekal serta boleh diguna-semula.

Kata kunci: Con A; glikoenzim; lektin; nanobunga

### ABSTRACT

Specific interaction between concanavalin A (Con A), a plant lectin from jackbean, with mannose core in N-glycans can be exploited to immobilise glycoenzymes. In this study, we prepared Con A-copper sulphate hybrid nanoflower (CCHN) as a novel carrier to immobilise horseradish peroxidase (HRP), a widely used glycoenzyme in bioanalytical application. The morphology of the prepared CCHN was determined using field emission scanning electron microscopy (FESEM), which showed flower-like microstructures with an average diameter size of 51.5 µm with and wide petal size of an approximately 2 µm. Then, HRP immobilisation optimisation experiments were carried out in Eppendorf tubes and microplates, which both formats showed the highest A<sub>450</sub> measurements at 100 µg/mL HRP and 10 µg/mL CCHN mixture. However, twice HRP activities (A<sub>450</sub> = 1.58) were recorded when using Eppendorf tubes format as compared to microplate format (A<sub>450</sub> = 0.76) and thus was used for further experiments. Furthermore, supernatant obtained after each washing step showed very low A<sub>280</sub> values up to four washing cycles, indicating HRP was strongly immobilised to the CCHN and no enzyme leakage into solution. Meanwhile, regeneration study showed that single washing step using inhibitory sugar, methyl α-mannose, at 0.1 M can effectively detach HRP from CCHN. Moreover, reproducibility test using CCHN prepared in three different batches showed consistent HRP activity readings indicating good reproducibility. This study highlighted the potential application of lectin hybrid nanoflower as a simple, reproducible and reusable carrier for glycoenzyme immobilisation.

Keywords: Con A; glycoenzyme; lectin; nanoflowers

## PENDAHULUAN

Nanobunga merupakan nanobahan berbentuk bunga yang telah digunakan dalam pelbagai aplikasi seperti katalisis (Yang et al. 2023), biosensor (Liu et al. 2017) dan rawatan air (Lin & Chen 2020). Nanobunga boleh disintesis menggunakan bahan organik dan bahan bukan organik atau gabungan kedua-duanya (hibrid) (Lee, Jang & Lee 2022). Nanobunga hibrid ditemui secara tidak sengaja apabila larutan  $\text{CuSO}_4$  ditambah kepada salin berpenimbal fosfat (PBS) yang mengandungi albumin serum lembu (BSA) dan mendakan biru yang mempunyai struktur bunga didapati terbentuk di bahagian bawah tiub tindak balas selepas tiga hari (Ge, Lei & Zare 2012). Penyediaan nanobunga hibrid ini membolehkan biomolekul organik seperti protein dipegunkan pada nanostruktur yang mempunyai luas permukaan tinggi melalui pembentukan kompleks antara ion logam dengan atom nitrogen kumpulan amida pada tulang belakang protein dan residu asid amino seperti histidin (Yang & Yang 2022). Selain penyediaannya yang mudah dan mesra alam sekitar, nanobunga hibrid mempunyai kelebihan lain seperti mempunyai nisbah permukaan-kepada-isi padu yang tinggi yang memberi kesan kepada peningkatan kapasiti pemegunan biomolekul serta peresapan substrat yang baik (Shende, Kasture & Gaud 2018; Tran & Kim 2018). Antara biomolekul yang dilaporkan pernah digunakan sebagai komponen organik untuk penghasilan nanobunga hibrid termasuk enzim (Yin et al. 2015), antibodi (Zeinhom et al. 2018), DNA (Qi et al. 2021) dan lektin (Bu et al. 2018).

Lektin merupakan sejenis kumpulan protein yang boleh mengikat pada struktur oligosakarida khusus yang dijumpai pada glikoprotein dan glikokonjugat lain seperti glikolipid. Pengikatan lektin pada struktur glikan tertentu adalah secara berbalik melalui ikatan hidrogen, koordinasi logam, *van der Waals* serta interaksi hidrofobik (Silva 2019). Concanavalin A (Con A) merupakan lektin daripada tumbuhan *jackbean* yang mempunyai kekhususan yang tinggi terhadap teras manosa pada glikan-N dan merupakan lektin yang paling kerap digunakan dalam pelbagai kajian termasuk pembangunan kaedah diagnostik klinikal seperti pengesanan sel kanser (Sha et al. 2020), hepatitis (Takahashi & Fukusato 2017) dan bakteria patogen (Wang et al. 2019). Con A turut digunakan sebagai penyokong untuk pemegunan glikoenzim seperti selulase (Sankarraj & Nallathambi 2015), nuklease  $\text{P}_1$  (Huang et al. 2018), inulinase (Kilimci et al. 2021) dan glukosa oksidase (Sugiyama et al. 2023) dan antara kelebihan yang dilaporkan menggunakan kaedah ini termasuk orientasi pemegunan protein yang terkawal dan pemegunan yang kuat serta berbalik.

Sehingga kini, enzim merupakan komponen organik yang paling banyak digunakan dalam penyediaan nanobunga hibrid berbanding protein lain. Penyediaan nanobunga hibrid menggunakan lektin tidak banyak dilaporkan dan lebih tertumpu kepada aplikasi pengesanan mikrob yang menggunakan campuran lektin dan molekul

pengisyaratkan seperti enzim (Ye et al. 2016), hormon (Bu et al. 2018) dan metaloprotein (Wang et al. 2018) sebagai komponen organiknya. Oleh itu, kajian ini dijalankan untuk menyediakan dan mencirikan nanobunga hibrid yang disediakan menggunakan hanya lektin sebagai komponen organik serta mengkaji interaksinya dengan biomolekul yang lebih kecil seperti glikoenzim. Dalam kajian ini, lektin Con A digunakan kerana keupayaannya mengikat pada pelbagai glikoenzim, termasuk peroksidase daripada lobak putih (HRP), manakala  $\text{CuSO}_4$  digunakan sebagai komponen tak organik untuk menghasilkan nanobunga hibrid Con A-  $\text{CuSO}_4$  (CCHN). Potensi CCHN sebagai pembawa (*carrier*) untuk pemegunan glikoenzim turut dikaji dengan menjalankan ujian kebolegunaan semula dan kebolehulangan aktiviti HRP yang dipegunkan pada CCHN.

## BAHAN DAN KAEDAH

Tablet salina berpenimbal fosfat (PBS), natrium bikarbonat ( $\text{NaHCO}_3$ ), natrium karbonat dekahidrat ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ), natrium klorida ( $\text{NaCl}$ ), magnesium klorida ( $\text{MgCl}_2$ ), kalsium klorida ( $\text{CaCl}_2$ ),  $\text{H}_2\text{SO}_4$  dan Tween® 20 dibeli daripada Sigma Aldrich (St. Louis, MO). Lektin concanavalin A (Con A) diperolehi daripada Vector Laboratories (Burlingame, CA). Peroksidase lobak putih (HRP), plat telaga Nunc® Maxisorp 384 dan reagen substrat 1-Step Ultra TMB-ELISA telah dibeli daripada Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA).

## PENYEDIAAN CCHN

Bagi penyediaan CCHN, sebanyak 0.1 mg/mL Con A ditambah kepada 10 mM PBS (pH 7.4). Kemudian, 50  $\mu\text{L}$  larutan  $\text{CuSO}_4$  (120 mM) telah ditambah kepada campuran diikuti dengan penggeraman pada 25 °C selama tiga hari. Mendakan yang terbentuk dikumpul melalui pengemparan (10,000 rpm, 5 minit) dan dibasuh dengan air ternyahion sebanyak tiga kali.

## PENGOPTIMUMAN KEPEKATAN HRP DAN CCHN

Pengoptimuman kepekatan campuran HRP dan CCHN untuk pemegunan dilakukan menggunakan dua format pengasaian enzim yang umum iaitu mikroplat dan tiub Eppendorf. Kepekatan HRP yang digunakan adalah 100, 10, 1 dan 0.1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  manakala kepekatan CCHN yang digunakan adalah 10, 1 dan 0.1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

## FORMAT TIUB EPPENDORF

Untuk format tiub Eppendorf, CCHN dan HRP dieram selama dua jam dalam tiub Eppendorf untuk membentuk kompleks CCHN dan HRP terpegun (CCHN-HRP). Seterusnya, langkah pembasuhan dilakukan dengan menggunakan 1000  $\mu\text{L}$  PBST diikuti dengan pengemparan pada 10 000 rpm. Palet yang mengandungi CCHN-HRP

dikumpulkan manakala supernatan disingkirkan. Langkah pembasuhan ini diulang sebanyak empat kali. Seterusnya langkah penentuan aktiviti HRP terpegun dilakukan dengan penambahan 500  $\mu\text{L}$  substrat 1-Step Ultra TMB-ELISA ke dalam tiub yang mengandungi CCHN-HRP dan dieram selama 30 minit. Kemudian, 50  $\mu\text{L}$  larutan dipindahkan ke telaga mikroplat. Tindak balas dihentikan dengan menambahkan 50  $\mu\text{L}$  2 M  $\text{H}_2\text{SO}_4$  serta-merta. Keamatan warna yang dibangunkan dalam tiub diukur pada panjang gelombang 450 nm ( $A_{450}$ ) menggunakan pembaca plat Multiskan FC (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA).

#### FORMAT MIKROPLAT

Untuk format mikroplat, prosedur yang digunakan adalah mengikut prosedur umum asai immunojerap terangkai enzim (ELISA) yang CCHN dipegunkan terlebih dahulu dengan menambah 100  $\mu\text{L}$  0.1 mg/mL CCHN pada permukaan telaga mikroplat Maxisorp dan dieram semalaman pada suhu 4  $^{\circ}\text{C}$ . Telaga mikroplat kemudiannya dibasuh sebanyak empat kali dengan 100  $\mu\text{L}$  PBS-T. Selepas langkah pembasuhan, 100  $\mu\text{L}$  HRP ditambah ke dalam setiap telaga dan dieram selama dua jam. Kemudian, penentuan aktiviti HRP dilakukan dengan menambah 50  $\mu\text{L}$  substrat 1-Step Ultra TMB-ELISA pada setiap telaga diikuti dengan pengeraman selama 30 minit sebelum tindak balas dihentikan dengan penambahan 50  $\mu\text{L}$  2 M  $\text{H}_2\text{SO}_4$ . Proses ini diulang menggunakan Con A natif sebagai kawalan. Keamatan warna diperhatikan dalam setiap telaga dan diukur pada  $A_{450}$  menggunakan pembaca plat Multiskan FC.

#### UJIAN KEBOLEHGUNAAN SEMULA

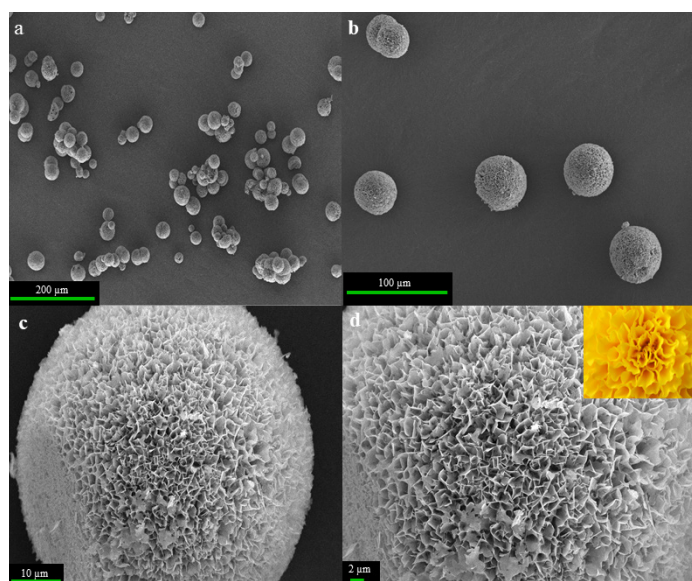
Bagi menilai kebolehgunaan semula CCHN sebagai matriks pemegungan HRP, prosedur pemegungan dan langkah pembasuhan yang sama untuk format tiub Eppendorf dilakukan, diikuti dengan langkah pembasuhan tambahan yang dilakukan dengan mengeringkan kompleks CCHN-HRP dalam penimbal basuhan yang mengandungi gula perencat metil  $\alpha$ -manosa (0.1 M) selama 1 jam pada suhu bilik. Selepas itu, pengemparan pada 10,000 rpm selama 5 minit dilakukan dan palet yang terhasil dikumpulkan. Seterusnya, langkah penentuan aktiviti HRP dilakukan mengikut prosedur yang diterangkan dalam format tiub Eppendorf. Uji kaji diulang sebanyak tiga kali dengan langkah pemegungan HRP yang baru dilakukan bagi setiap ulangan ( $n=3$ ), iaitu selepas tiub Eppendorf yang mengandungi reagen substrat yang telah bertindak balas dibasuh dengan PBST sebanyak empat kali.

#### UJIAN KEBOLEHULANGAN

Tiga kelompok CCHN dengan kepekatan yang sama dinilai kebolehulangannya untuk menghasilkan aktiviti yang optimum pada waktu yang berbeza ( $n=3$ ). Ujian kebolehulangan aktiviti HRP yang terpegun pada CCHN dilakukan menggunakan prosedur format tiub Eppendorf menggunakan tiga kelompok CCHN baharu pada kepekatan (0.1 mg/mL) telah disediakan pada waktu yang berbeza.

#### ANALISIS DATA

Microsoft Excel digunakan untuk menjadualkan data yang dikumpul. GraphPad Prism versi 8.0.2 (GraphPad Software,



RAJAH 1. Imej FESEM CCHN yang diperoleh pada voltan pemecut 3 kV pada pembesaran (a), 100x; (b), 260x; (c), 2000x dan (d), 3000x; sisipan menunjukkan perbandingan CCHN dengan bunga sebenar (*marigold*)

Inc., San Diego, CA) telah digunakan untuk menjalankan analisis statistik. Semua data ditunjukkan sebagai  $\text{min} \pm \text{SD}$ . Graf bar digunakan untuk membandingkan min. Data yang diperoleh untuk pengoptimuman telah menjalani analisis lanjut melalui *t-test* menggunakan perisian GraphPad Prism versi 8.3.3 (San Diego, CA). Analisis ini bertujuan untuk mengenal pasti perbezaan ketara dengan nilai P kurang daripada 0.05 dianggap signifikan secara statistik.

#### HASIL DAN PERBINCANGAN

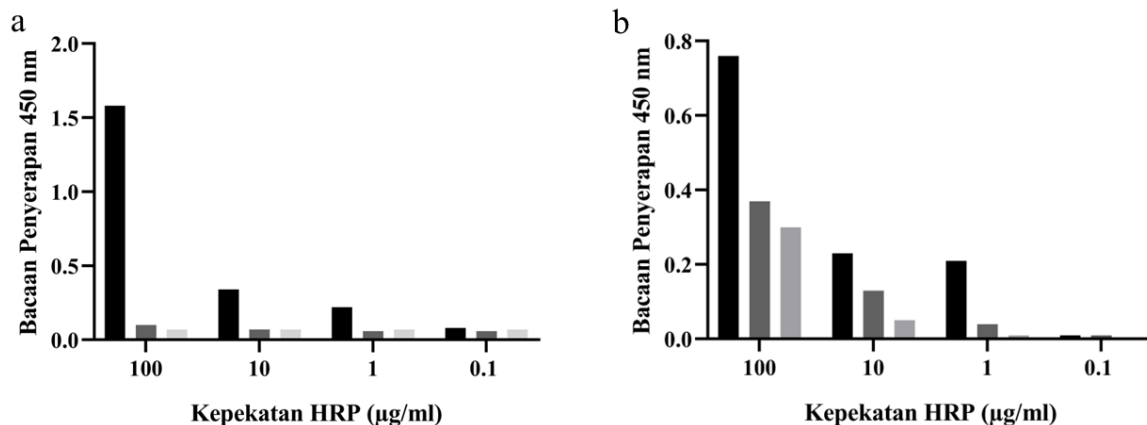
Proses pembentukan nanobunga hibrid ConA-CuSO<sub>4</sub> (CCHN) melibatkan gabungan Con A dan kuprum sulfat (CuSO<sub>4</sub>) dalam larutan penimbal fosfat pada pH 7.4 dan suhu bilik. Selepas tiga hari, mendakan dengan struktur berliang seperti bunga muncul. Ciri CCHN diperhatikan menggunakan mikroskop elektron pengimbasan pancaran medan (FESEM) menggunakan voltan pemecut sebanyak 3 kV. Imej FESEM pada pembesaran sebanyak 100x yang diperoleh menunjukkan morfologi CCHN kelihatan seperti zarah-mikro berbentuk sfera (Rajah 1(A)). Namun, pada pembesaran sebanyak 260x, struktur bunga bersaiz mikro serta struktur hierarki tiga dimensi bagi CCHN yang disediakan dapat dilihat (Rajah 1(B)) dengan purata diameter 3  $\mu\text{m}$ . Pemerhatian lanjut mengenai struktur CCHN menunjukkan struktur helaian mikro dalam bentuk kelopak bunga (Rajah 1(C)) dengan setiap helaian kelopak yang terbentuk mempunyai anggaran saiz sebanyak 2  $\mu\text{m}$  (Rajah 1D). Struktur hierarki dengan nisbah permukaan-isi padu yang tinggi ditunjukkan dengan CCHN terdiri daripada beratus-ratus kelopak bunga persis bunga *marigold* (Rajah 1(D), sisipan). Keputusan ini selaras dengan kajian lepas yang menunjukkan nanobunga lektin Con A morfologi asas yang sama iaitu sfera, tetapi berbeza

dari segi saiz diameternya iaitu masing-masing sekitar 5  $\mu\text{m}$  serta bentuk kelopak bunga. Namun, kajian ini menggunakan campuran Con A dengan bahan organik lain seperti hemin Wang et al. (2018) dan hCG (Bu et al. 2018).

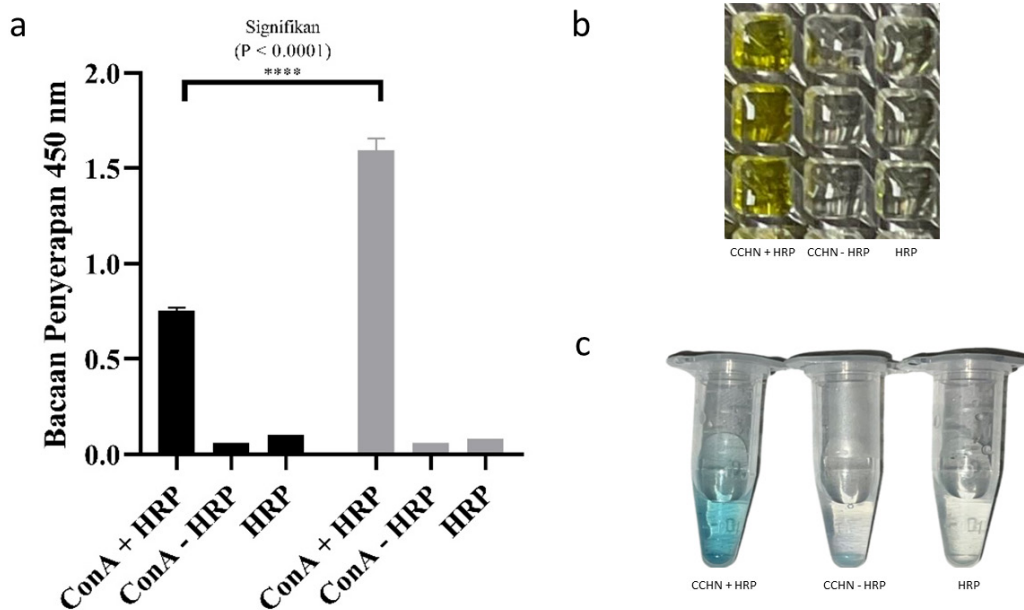
Seterusnya, aktiviti HRP yang dipegunkan pada CCHN dikaji secara kolorimetrik. Bagi mencapai aktiviti yang maksimum untuk pemegunan HRP, pengoptimuman campuran kepekatan CCHN dan HRP dilakukan menggunakan dua format pengasaian yang umum iaitu mikroplat dan tiub Eppendorf. Campuran CCHN pada kepekatan 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  dan HRP pada pencairan kepekatan 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  didapati memberikan bacaan  $A_{450}$  tertinggi bagi kedua-dua format tiub Eppendorf dan mikroplat (Rajah 2(A) dan 2(B)), sekali gus menunjukkan nisbah campuran kepekatan CCHN dan HRP yang paling optimum. Namun, bacaan penyerapan  $A_{450}$

untuk pemegunan HRP pada CCHN menggunakan format tiub Eppendorf ( $A_{450} = 1.58$ ) didapati dua kali ganda lebih tinggi berbanding menggunakan format mikroplat ( $A_{450} = 0.76$ ). Hal yang sama turut diperhatikan dalam uji kaji kawalan (Rajah 3) dengan HRP yang dipegunkan pada Con A natif menggunakan format mikroplat pada nisbah campuran yang telah dioptimumkan turut menunjukkan bacaan  $A_{450}$  yang dua kali ganda lebih rendah ( $A_{450} = 0.75$ ) berbanding HRP yang dipegunkan pada CCHN menggunakan format tiub Eppendorf ( $A_{450} = 1.59$ ).

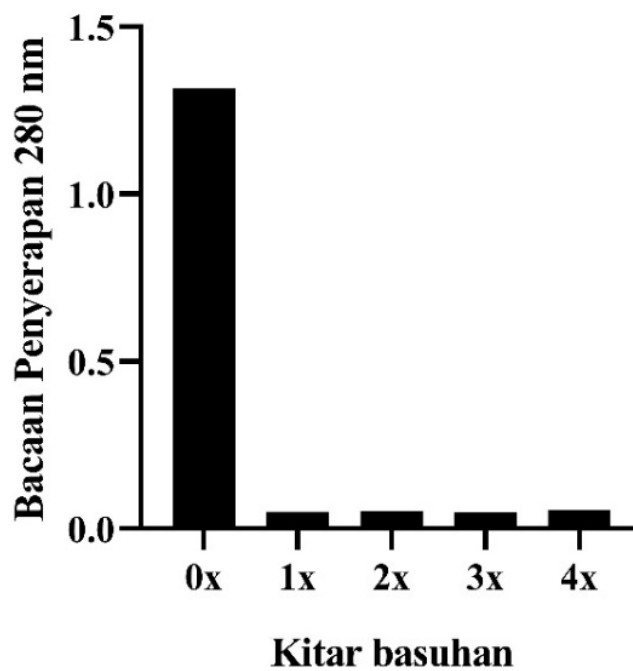
Hasil ini membuktikan HRP boleh dipegunkan menggunakan Con A yang diperangkap (CCHN) atau bebas (natif) melalui interaksi khusus lektin-karbohidrat kerana kehadiran beberapa kumpulan gula tertentu seperti glukosa dan manosa pada glikan yang terangkai pada HRP (Ali et al. 2011; Welch, Turner & Preast 2008). Perubahan warna menunjukkan aktiviti HRP yang dipegunkan dengan penglibatan substrat kromogenik



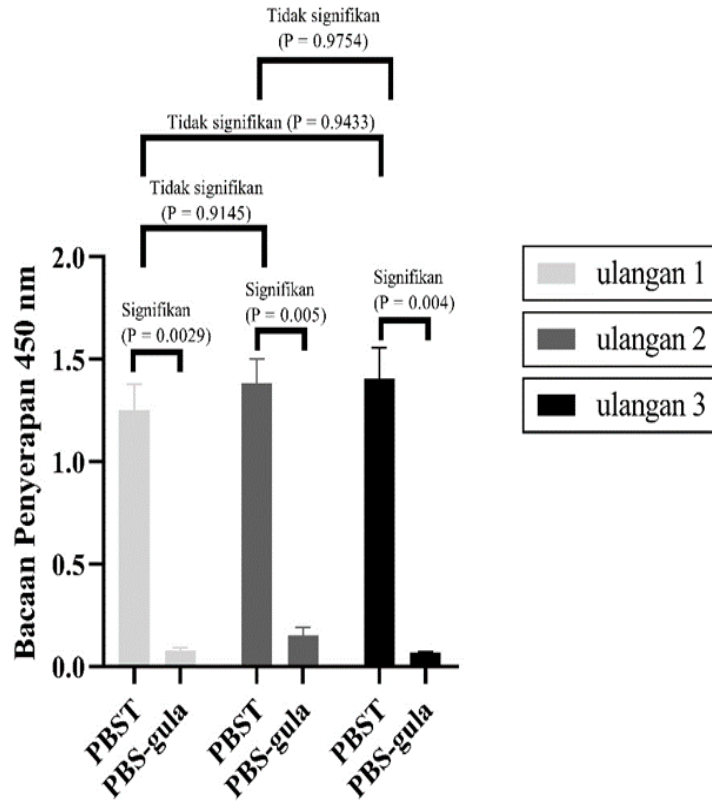
RAJAH 2. Pengoptimuman kepekatan CCHN dan HRP untuk langkah pemegunan menggunakan format (a), tiub Eppendorf dan (b), plat mikro. Kepekatan CCHN yang berbeza ditunjukkan oleh warna carta bar berbeza iaitu hitam (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), kelabu gelap (1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) dan kelabu cair (0.1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )



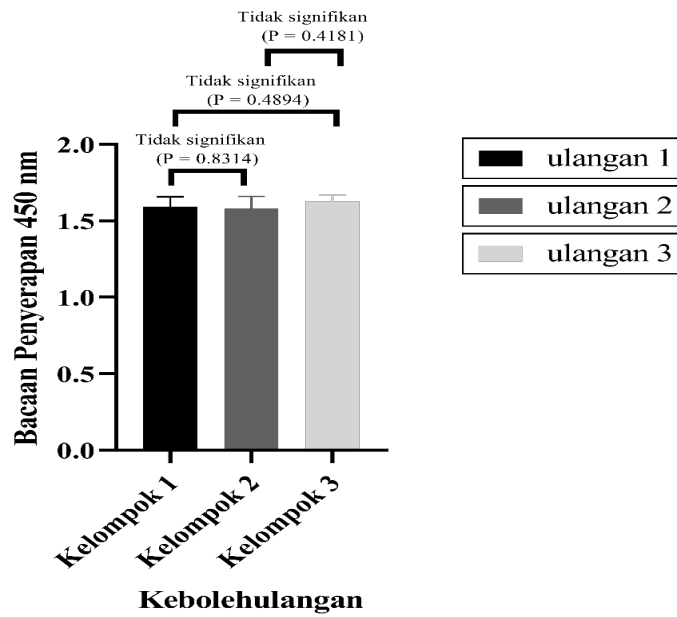
RAJAH 3. (a) Perbandingan aktiviti HRP yang dipegunkan pada Con A natif (hitam) dan CCHN (kelabu) menggunakan kepekatan yang telah dioptimumkan ( $n=3$ ). Gambar-gambar penjanaan warna bagi kompleks CCHN-HRP, CCHN tanpa HRP dan hanya HRP untuk format (b) mikroplat (selepas tindak balas dengan reagen substrat TMB dan  $H_2SO_4$ ) dan (c) tiub Eppendorf (selepas tindak balas dengan reagen substrat TMB). Bagi format tiub Eppendorf, penambahan  $H_2SO_4$  dilakukan selepas reagen TMB dalam tiub telah bertindak balas dan dipindahkan ke mikroplat untuk mengelakkan penyahasian kompleks CCHN-HRP



RAJAH 4. Keberkesanan langkah pembasuhan (PBST) dan pengesanan HRP yang tidak mengikat secara khusus untuk empat kitaran basuhan kompleks CCHN-HRP



RAJAH 5. Kebolehgunaan semula CCHN untuk pemegunan HRP bagi kitaran regenerasi 1 (kelabu), kitaran regenerasi 2 (kelabu gelap) dan kitaran regenerasi 3 (hitam). Bar ralat menunjukkan sisihan piawai untuk pengukuran yang dilakukan secara tripliket (n=3)



RAJAH 6. Kebolehgunaan aktiviti HRP yang dipegunkan pada CCHN untuk tiga kelompok berbeza. Bar ralat menunjukkan sisihan piawai untuk pengukuran yang dilakukan secara tripliket (n=3)

3,3',5,5' tetrametilbenzidina (TMB). HRP memungkinkan tindak balas dengan TMB, yang berfungsi sebagai penderma elektron yang mengalami pengoksidaan, manakala H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> diturunkan secara serentak kepada O<sub>2</sub> dan H<sub>2</sub>O yang menghasilkan produk berwarna biru (Rajah 3(C)), yang kemudiannya diberhentikan oleh H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> untuk menghasilkan warna kuning (Rajah 3(B)) (Li et al. 2019).

Menerusi kajian ini, kedua-dua format tiub Eppendorf dan mikroplat didapati boleh digunakan untuk tujuan pengesanan aktiviti HRP terpegun, namun format mikroplat memberi bacaan yang rendah berbanding tiub Eppendorf kerana isi padu telaga mikroplat serta luas permukaannya yang lebih rendah hanya dapat memuatkan sampel seperti protein dan reagen pada kuantiti yang sedikit (Auld et al. 2004; Lewis & Gibney 2023). Selain itu, penentuan aktiviti HRP menggunakan format tiub Eppendorf adalah lebih mudah dan cepat kerana kompleks CCHN-HRP yang terhasil bersaiz besar membolehkannya dipisahkan daripada larutan seperti reagen substrat dan penimbal pembasuhan melalui pengemparan serta memberikan kelebihan dari segi kebolegunaan semula. Format ini tidak dapat digunakan sekiranya pemegunan HRP dilakukan pada lektin natif seperti uji kaji kawalan kerana saiz Con A natif yang kecil tidak dapat membentuk palet selepas pengemparan, justeru memerlukan penggunaan format mikroplat dengan Con A natif perlu dipegunkan pada permukaan mikroplat terlebih dahulu. Oleh itu, format tiub Eppendorf digunakan untuk kajian seterusnya kerana kelebihannya dari segi lebih sensitif, mudah dan cepat serta boleh diguna semula.

Dalam pembangunan asai lektin, langkah pembasuhan merupakan langkah yang penting untuk mengurangkan isyarat tidak khusus dan bilangan kitaran langkah pembasuhan yang dilakukan berbeza mengikut prosedur yang dilakukan serta komponen asai yang digunakan. Sebagai contoh, Khairol Mokhtar et al. (2022) melaporkan sebanyak empat kali basuhan diperlukan untuk mengurangkan isyarat tidak khusus bagi asai lektin yang dibangunkan untuk mengesan antigen khusus prostat (PSA). Dalam kajian ini, langkah pembasuhan menggunakan PBST diulang sebanyak empat kitaran selepas pemegunan HRP pada CCHN dengan supernatan yang terhasil selepas pengemparan diukur pada panjang gelombang 280 nm (A<sub>280</sub>) untuk mengesan kehadiran HRP yang tidak mengikat secara khusus. Hasil kajian menunjukkan bacaan A<sub>280</sub> yang rendah bagi setiap kitaran pembasuhan iaitu 0.051 (basuhan pertama), 0.052 (basuhan kedua), 0.049 (basuhan ketiga) dan 0.057 bagi basuhan keempat. Ini mencadangkan bahawa HRP yang tidak mengikat pada CCHN dapat disingkirkan pada kitaran pertama langkah pembasuhan serta HRP yang terpegun pada CCHN terikat secara kuat dan tidak bocor ke larutan.

Kebolegunaan semula sesuatu pembawa untuk pemegunan enzim adalah penting dari sudut ekonomi kerana mampu mengurangkan kos keseluruhan operasi dalam sesuatu industri (Tarhan et al. 2020). Umum mengetahui

bahawa lektin mengikat pada karbohidrat secara berbalik dan boleh direncat menggunakan gula perencat yang sesuai pada kepekatan yang tinggi. Berbanding gula ringkas lain, metil  $\alpha$ -manosa merupakan perencat yang poten bagi Con A. Hal ini dapat dilihat melalui penurunan A<sub>450</sub> yang signifikan (P<0.05) apabila kompleks CCHN-HRP yang terbentuk dieram dalam 0.1 M metil  $\alpha$ -manosa (PBS-gula) untuk tiga kitaran regenerasi berturut-turut (Rajah 5). Keputusan ini menunjukkan bahawa HRP tidak dapat mengikat tapak pengikat karbohidrat Con A dengan kehadiran gula ini seperti yang dilaporkan oleh dos Santos Silva et al. (2019). Selepas langkah pembasuhan (PBST) untuk menyingkirkan gula perencat dan penambahan semula HRP dilakukan, aktiviti HRP didapati meningkat semula kepada A<sub>450</sub> >1.2 dan tidak berbeza secara signifikan (P>0.05) untuk ketiga-tiga kitaran regenerasi yang dilakukan, membuktikan aktiviti Con A dan HRP pada kompleks CCHN-HRP kekal terpelihara, sekali gus menunjukkan kebolegunaan semula CCHN yang baik sebagai pembawa untuk pemegunan glikoenzim.

Seterusnya, ujian kebolehulangan dilakukan menggunakan tiga kelompok CCHN yang berbeza untuk pemegunan HRP pada kepekatan yang dioptimumkan. Seperti yang ditunjukkan dalam Rajah 6, bacaan A<sub>450</sub> yang menunjukkan aktiviti HRP yang dipegunkan menggunakan ketiga-tiga kelompok CCHN adalah tekal dan tidak berbeza secara signifikan (P>0.05). Keputusan kajian ini menunjukkan kebolehulangan aktiviti HRP yang dipegunkan pada kompleks CCHN-HRP yang baik, selaras dengan kajian lain yang menggunakan strategi berlainan seperti zarah magnetik (Han et al. 2019) untuk menyediakan nanobunga hibrid HRP.

#### KESIMPULAN

Melalui kajian ini, nanobunga hibrid *novel* iaitu nanobunga hibrid Con A-CuSO<sub>4</sub> (CCHN) yang mempunyai morfologi persis bunga *marigold* dengan saiz diameter purata 51.5  $\mu$ m telah berjaya disediakan dan digunakan untuk pemegunan glikoenzim HRP melalui interaksi khusus lektin-karbohidrat. Pembentukan kompleks CCHN-HRP yang bersaiz besar membolehkannya dipisahkan dengan mudah melalui pengemparan menggunakan tiub Eppendorf untuk langkah pembasuhan, pengasaan aktiviti serta regenerasi. Dalam keadaan yang dioptimumkan, CCHN menunjukkan kebolegunaan semula serta kebolehulangan yang baik sebagai pembawa untuk pemegunan HRP.

#### PENGHARGAAN

Setinggi-tinggi penghargaan ditujukan kepada Kementerian Pengajian Tinggi (KPT) Malaysia atas pembiayaan penyelidikan ini di bawah Skim Geran Penyelidikan Fundamental (FRGS), FRGS/1/2019/STG04/UKM/03/1 serta pihak Universiti Kebangsaan Malaysia untuk penggunaan makmal dan peralatan.

## RUJUKAN

- Ali, M., Ramirez, P., Tahir, M.N., Mafe, S., Siwy, Z., Neumann, R., Tremel, W. & Ensinger, W. 2011. Biomolecular conjugation inside synthetic polymer nanopores via glycoprotein–lectin interactions. *Nanoscale* 3(4): 1894-1903.
- Auld, D.S., Coassin, P.A., Coussens, N.P., Hensley, P., Klumpp-Thomas, C., Michael, S., Sittampalam, G.S., Trask, O.J., Wagner, B.K., Weidner, J.R., Wildey, M.J. & Dahlin, J.L. 2004. Microplate selection and recommended practices in high-throughput screening and quantitative biology. Dlm. *The Assay Guidance*, disunting oleh Markossian, S., Grossman, A., Arkin, M., Auld, D., Austin, C., Baell, J., Brimacombe, K., Chung, T.D.Y., Coussens, N.P., Dahlin, J.L., Devanarayan, V., Foley, T.L., Glicksman, M., Gorshkov, K., Haas, J.V., Hall, M.D., Hoare, S., Inglese, J., Iversen, P.W., Lal-Nag, M., Li, Z., Manro, J.R., McGee, J., McManus, O., Pearson, M., Riss, T., Saradjian, P., Sittampalam, G.S., Tarselli, M., Trask Jr., O.J., Weidner, J.R., Wildey, M.J., Wilson, K., Xia, M. & Xu, X. Bethesda (MD): Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences. hlm. 1381-1429.
- Bu, S., Wang, K., Ju, C., Han, Y., Li, Z., Du, P., Hao, Z., Li, C., Liu, W. & Wan, J. 2018. A pregnancy test strip for detection of pathogenic bacteria by using concanavalin A-human chorionic gonadotropin- $\text{Cu}_3(\text{PO}_4)_2$  hybrid nanoflowers, magnetic separation, and smartphone readout. *Microchimica Acta* 185: 464.
- dos Santos Silva, P.M., de Oliveira, W.F., Albuquerque, P.B.S., dos Santos Correia, M.T. & Coelho, L.C.B.B. 2019. Insights into anti-pathogenic activities of mannose lectins. *International Journal of Biological Macromolecules* 140: 234–244.
- Ge, J., Lei, J. & Zare, R.N. 2012. Protein–inorganic hybrid nanoflowers. *Nature Nanotechnology* 7(7): 428-432.
- Han, J., Luo, P., Wang, L., Li, C., Mao, Y. & Wang, Y. 2019. Construction of magnetic nanoflower biocatalytic system with enhanced enzymatic performance by biomineralization and its application for bisphenol A removal. *Journal of Hazardous Materials* 380: 120901.
- Huang, J., Zhuang, W., Wei, C., Mu, L., Zhu, J., Zhu, Y., Wu, J., Chen, Y. & Ying, H. 2018. Concanavalin A induced orientation immobilization of Nuclease P1: The effect of lectin agglutination. *Process Biochemistry* 64: 160-169.
- Khairol Mokhtar, N.H.I., Hussin, A., Hamid, A.A., Zainal Ariffin, S.H. & Shahidan, M.A. 2022. Systematic optimisation of microtiter plate lectin assay to improve sialic acid linkage detection. *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening* 25(9): 1507-1517.
- Kilimci, U., Evli, S., Öndeş, B., Uygun, M. & Uygun, D.A. 2021. Inulinase immobilized lectin affinity magnetic nanoparticles for inulin hydrolysis. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 193(5): 1415-1426.
- Lee, S.J., Jang, H. & Lee, D.N. 2022. Inorganic nanoflowers - synthetic strategies and physicochemical properties for biomedical applications: A review. *Pharmaceutics* 14(9): 1887.
- Lewis, A.G. & Gibney, P.A. 2023. A rapid method to determine growth-limiting nutrient concentrations for yeast in a microplate spectrophotometer. *Current Protocols* 3(5): e376.
- Li, M., Su, H., Tu, Y., Shang, Y., Liu, Y., Peng, C. & Liu, H. 2019. Development and application of an efficient medium for chromogenic catalysis of tetramethylbenzidine with horseradish peroxidase. *ACS Omega* 4(3): 5459-5470.
- Lin, M. & Chen, Z. 2020. A facile one-step synthesized epsilon-MnO<sub>2</sub> nanoflowers for effective removal of lead ions from wastewater. *Chemosphere* 250: 126329.
- Liu, Y., Chen, J., Du, M., Wang, X., Ji, X. & He, Z. 2017. The preparation of dual-functional hybrid nanoflower and its application in the ultrasensitive detection of disease-related biomarker. *Biosensors and Bioelectronics* 92: 68-73.
- Qi, L., Yang, M., Chang, D., Zhao, W., Zhang, S., Du, Y. & Li, Y. 2021. A DNA nanoflower-assisted separation-free nucleic acid detection platform with a commercial pregnancy test strip. *Angewandte Chemie International Edition* 60(47): 24823-24827.
- Sankarraj, N. & Nallathambi, G. 2015. Immobilization and characterization of cellulase on concanavalin A (ConA)-layered calcium alginate beads. *Biocatalysis and Biotransformation* 33(2): 81-88.
- Sha, Q., Guan, R., Su, H., Zhang, L., Liu, B-F., Hu, Z. & Liu, X. 2020. Carbohydrate-protein template synthesized high mannose loading gold nanoclusters: A powerful fluorescence probe for sensitive Concanavalin A detection and specific breast cancer cell imaging. *Talanta* 218: 121130.
- Shende, P., Kasture, P. & Gaud, R.S. 2018. Nanoflowers: The future trend of nanotechnology for multi-applications. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology* 46(sup1): 413-422.
- Silva, M.L.S. 2019. Lectin biosensors in cancer glycan biomarker detection. Dlm. *Advances in Clinical Chemistry*, disunting oleh Makowski, G.S. Elsevier. hlm. 1-61.
- Sugiyama, K., Sato, F., Komatsu, S., Kamijo, T., Yoshida, K., Kawabe, Y., Nishikawa, H., Fujimura, T., Takahashi, Y. & Sato, K. 2023. Highly sensitive glucose electrochemical sensor using sugar-lectin interactions. *Electrochemical Science Advances* 4(5): e2300015.



- Takahashi, Y. & Fukusato, T. 2017. Animal models of liver diseases. Dlm. *Animal Models for the Study of Human Disease*. 2nd ed. Massachusetts: Academic Press. hlm. 313-339.
- Tarhan, T., Ulu, A., Sariçam, M., Çulha, M. & Ates, B. 2020. Maltose functionalized magnetic core/shell Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@Au nanoparticles for an efficient l-asparaginase immobilization. *International Journal of Biological Macromolecules* 142: 443-451.
- Tran, T.D. & Kim, M.I. 2018. Organic-inorganic hybrid nanoflowers as potent materials for biosensing and biocatalytic applications. *BioChip Journal* 12(4): 268-279.
- Wang, K.Y., Bu, S.J., Ju, C.J., Han, Y., Ma, C.Y., Liu, W.S., Li, Z.Y., Li, C.T. & Wan, J.Y. 2019. Disposable syringe-based visual immunotest for pathogenic bacteria based on the catalase mimicking activity of platinum nanoparticle-concanavalin A hybrid nanoflowers. *Microchimica Acta* 186: 57.
- Wang, K.Y., Bu, S.J., Ju, C.J., Li, C.T., Li, Z.Y., Han, Y., Ma, C.Y., Wang, C.Y., Hao, Z., Liu, W.S. & Wan, J.Y. 2018. Hemin-incorporated nanoflowers as enzyme mimics for colorimetric detection of foodborne pathogenic bacteria. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* 28(23-24): 3802-3807.
- Welch, K.T., Turner, T.A. & Preast, C.E. 2008. Rational design of novel glycomimetics: Inhibitors of concanavalin A. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* 18(24): 6573-6575.
- Yang, F., Xiang, C., Fang, S., Xu, F., Sun, L., Shen, C.Y. & Zou, Y. 2023. Synthesis and catalytic performance of nanoflower-like Ru@CoAl-LDH composite catalyst for NaBH<sub>4</sub> hydrolysis. *Journal of Alloys and Compounds* 945: 169280.
- Yang, N. & Yang, S. 2022. Synthesis of hydrolyzate-Cu<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> hybrid nanoflowers from the alkaline thermal hydrolysate of sludge. *Materials Today Communications* 31: 103824.
- Ye, R., Zhu, C., Song, Y., Lu, Q., Ge, X., Yang, X., Zhu, M.-J., Du, D., Li, H. & Lin, Y. 2016. Bioinspired synthesis of all-in-one organic-inorganic hybrid nanoflowers combined with a handheld pH meter for on-site detection of food pathogen. *Small* 12(23): 3094-3100.
- Yin, Y., Xiao, Y., Lin, G., Xiao, Q., Lin, Z. & Cai, Z. 2015. An enzyme-inorganic hybrid nanoflower based immobilized enzyme reactor with enhanced enzymatic activity. *Journal of Materials Chemistry B* 3(11): 2295-2300.
- Zeinhom, M.M.A., Wang, Y., Sheng, L., Du, D., Li, L., Zhu, M.-J. & Lin, Y. 2018. Smart phone based immunosensor coupled with nanoflower signal amplification for rapid detection of *Salmonella* Enteritidis in milk, cheese and water. *Sensors and Actuators B: Chemical* 261: 75-82.

\*Pengarang untuk surat-menyurat; email: mashraf@ukm.edu.my