

Peranan Saiz Nanozarah Zink Oksida dalam Prestasi Pemangkinan Foto, Perencatan Bakteria dan Ketoksikan

(Role of Zinc Oxide Nanoparticle Size in Photocatalytic Performance, Bacterial Inhibition and Toxicity)

RAFIDAH ABD RAHMAN^{1,*}, CHIN HUA CHIA² & NOOR AZLINA MASDOR³

¹*Agri-Nanotechnology Programme, Biotechnology and Nanotechnology Research Centre, MARDI Headquarters, GPO Box 12301, 50774 Kuala Lumpur, Malaysia*

²*Department of Applied Physics, Faculty of Science and Technology, Universiti Kebangsaan Malaysia, 43600 UKM Bangi, Selangor, Malaysia*

³*Post-Harvest Handling Programme, Industrial Crops Research Centre, MARDI Headquarters, GPO Box 12301, 50774 Kuala Lumpur, Malaysia*

Diserahkan: 11 Februari 2024/Diterima: 5 Jun 2024

ABSTRAK

Nanozarah zink oksida (ZnO NP) telah diubah suai melalui pengisaran bebola untuk mengkaji kesan saiz zarah pada sifat dan prestasi bahan. Pengisaran serbuk ZnO komersial selama 6 dan 12 jam telah menghasilkan ZnO NP dengan purata saiz antara 13.2-36.5 nm. Pelbagai teknik pencirian termasuk spektroskopi UV-Vis, XRD, FESEM, TEM dan analisis potensi Zeta telah digunakan untuk menentukan morfologi zarah nano, struktur hablur, kestabilan dan sifat optik. Aktiviti fotomangkin terhadap degradasi metilena biru adalah lebih rendah untuk ZnO NP yang dikisar berbanding dengan ZnO NP tulen di bawah sinaran UV. Ujian antibakteria menggunakan kaedah resapan cakera agar menunjukkan zon perencatan terbesar terhadap patogen tumbuhan *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* untuk ZnO NP tulen pada 100 mg/mL diikuti dengan ZnO NP yang dikisar 6 jam dan 12 jam. Ujian ketoksikan embrio ikan zebra menunjukkan penurunan kemandirian, kadar penetasan, kadar degupan jantung dan peningkatan kecacatan morfologi dan kematian yang bergantung kepada dos dan masa apabila terdedah kepada sampel ZnO NP. Kajian ini menunjukkan ketoksikan ZnO NP terhadap embrio ikan zebra dan fotomangkin adalah bergantung kepada saiz walaupun ujian antibakteria tidak dipengaruhi oleh saiz ZnO NP. Penemuan ini menunjukkan kepentingan pengoptimuman saiz nanozarah untuk aplikasi yang dikehendaki.

Kata kunci: Pengisaran bebola; pengubahsuaian bahan nano; saiz zarah; zink oksida

ABSTRACT

Zinc oxide nanoparticles (ZnO NPs) were modified via ball milling to investigate the effect of particle size on material properties and performance. Grinding of commercial ZnO powder for 6 and 12 h produced ZnO NPs with average sizes between 13.2-36.5 nm. Multiple characterization techniques including UV-Vis spectroscopy, XRD, FESEM, TEM, and Zeta potential analysis were used to determine the nanoparticle morphology, crystal structure, stability, and optical properties. The photocatalytic activity against methylene blue degradation was lower for the milled ZnO NPs compared to pure ZnO NPs under UV irradiation. Antibacterial testing using the agar disc diffusion method demonstrated the largest inhibition zone against the plant pathogen *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* for pure ZnO NPs at 100 mg/mL, followed by 6 h and 12 h-milled ZnO NPs. Zebrafish embryo toxicity assays showed decreased viability, hatching rates, heart rates, and increased morphological defects and mortality in a dose- and time-dependent manner upon exposure to the ZnO NP samples. The study showed the size dependent ZnO NPs toxicity in zebrafish embryos and photocatalysis although antibacteria tests were unaffected by ZnO NPs' size. The results highlight the importance of nanoparticle size optimization for intended applications.

Keywords: Ball mill; nanomaterial modification; particle size; zinc oxide

PENGENALAN

Sifat bahan nano dipengaruhi oleh banyak faktor antaranya saiz zarah. Saiz zarah ditakrifkan sebagai diameter atau dimensi zarah (Niroumand et al. 2023). Zarah jirim dengan diameter satu hingga seratus nanometer (nm) biasanya dirujuk sebagai nanozarah atau zarah ultrahalus. Apabila saiz zarah semakin mengecil, ia akan meningkatkan nisbah luas permukaan-kepada-isi padu bahan beberapa kali ganda dan mengubah tenaga permukaan berbanding saiz zarah yang lebih besar. Tenaga permukaan seterusnya mempengaruhi fenomena permukaan logam seperti pembinaan semula permukaan, pengasingan permukaan, pemangkinan, keretakan dan kadar pertumbuhan zarah tersebut (Shekhawat, Vauth & Pezoldt 2022). Daripada aspek biologi, saiz zarah yang kecil juga lebih mudah menembusi struktur biologi dan mengakses sasaran intrasel menjadikan ia lebih sesuai sebagai bahan antimikrob dan antikanser (Altammar 2023).

Parameter yang digunakan dalam sintesis bahan nano merupakan faktor utama yang mempengaruhi pembentukan saiz zarah (Mansoor et al. 2022). Nanozarah boleh dihasilkan menggunakan kaedah sintesis ‘bawah-ke-atas’ (daripada molekul/atom dalam fasa pepejal, cecair atau gas kepada zarah nano) atau pendekatan ‘atas-ke-bawah’ (daripada bahan pukal kepada zarah nano). Teknik pengisaran bebola ialah salah satu teknik sintesis bahan nano ‘atas-ke-bawah’ yang menukarkan bahan pukal kepada serbuk halus tanpa kehadiran pelarut atau dengan isi padu pelarut yang sangat kecil. Teknik sintesis ini adalah mudah, rendah kos, cepat dan ‘hijau’ untuk penyediaan zarah nano. Banyak kajian telah menunjukkan proses pengisaran bebola berjaya menghasilkan zarah bersaiz nano seperti nanozarah zink oksida (ZnO NP) menggunakan serbuk ZnO yang boleh diperolehi secara komersial (Palos et al. 2023; Singh et al. 2019).

ZnO NP adalah salah satu daripada bahan nano logam oksida yang bernilai dan pelbagai fungsi kerana ciri fizikal dan kimianya yang unik. Ia mempunyai kestabilan terma dan kimia yang tinggi selain spektrum penyerapan sinaran yang luas (Zhou et al. 2023). Di samping itu, ZnO NP adalah bioserasi dan ini menjadikannya sesuai untuk aplikasi biologi (Norazalina et al. 2023). Kajian yang meluas oleh penyelidik lain menunjukkan kesensitifan foto ZnO yang tinggi adalah diperlukan dalam proses fotomangkin yang digunakan untuk pemulihan alam sekitar dan ujian antibakteria (Al Hallak et al. 2023; Matei et al. 2023; Subash et al. 2023). Kesemua sifat ini berkaitan dengan morfologi dan struktur nano yang

khusus. Salah satu cara yang paling mudah dan berkesan untuk mengawal sifat ZnO NP adalah dengan mengubah saiznya. Kajian menunjukkan bahawa ZnO NP yang lebih kecil menunjukkan kesan sitotoksik yang tinggi berbanding dengan zarah yang lebih besar dari segi perencanan percambahan sel, kerosakan membran dan penjaan spesies reaktif oksigen (ROS) (Babayevska et al. 2022). Ini kerana saiz zarah yang lebih kecil lebih mudah merentasi dinding dan meresapi membran sel. Kajian oleh Miliauskienė et al. (2022) juga mendapati saiz ZnO NP yang lebih kecil meningkatkan kandungan fenol dan antioksidan daun Swiss chard (*Beta vulgaris* ssp. *cicla* L. cv. Barese) berbanding saiz nanozarah yang lebih besar.

Saiz zarah ialah sifat kritikal yang memberi kesan kepada zarah nano, namun pengetahuan yang mendalam mengenai kesannya masih belum difahami sepenuhnya berikutan percanggahan dalam laporan kepustakaan. Dalam kajian ini, ZnO NP telah dihasilkan melalui proses pengisaran bebola pada sela masa tertentu. ZnO NP yang terhasil ini telah dikaji dari segi aktiviti fotomangkin, kesan antimikrob pada patogen tumbuhan *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* dan ketoksikan pada embrio ikan zebra. Keputusan daripada kajian ini diharap dapat menjelaskan impak saiz ZnO yang terhasil daripada pengubahsuaian menggunakan pengisaran bebola terhadap parameter yang diuji.

BAHAN DAN KAEDAH

PENGUBAHSUAIAN BAHAN NANO MELALUI PROSES PENGISAR BEBOLA

Pengubahsuaian struktur fizikokimia serbuk komersial ZnO tulen dilakukan menggunakan alat pengisar bebola (Fritsch GmbH, Jerman). Serbuk berkenaan dimasukkan ke dalam kelongsong besi dan dikisar menggunakan bebola besi (diameter 10 mm). Proses pengisaran bola dikendalikan pada suhu bilik dan suasana udara ambien untuk jangka masa selama 6 dan 12 jam. Dalam semua uji kaji, nisbah bebola kepada serbuk yang digunakan ialah 10:1 dan kelajuan putaran 300 rpm.

PENCIRIAN SIFAT OPTIK DAN FIZIKAL

Kesemua serbuk sebelum dan yang terhasil selepas proses pengisaran dicirikan melalui UV-Vis (Optizen POP, Mecasys Korea), XRD (D8 Advance, Bruker), FESEM (Merlin, Zeiss) dan TEM (Talos L120C).

ANALISIS KEPOLISERAKAN DAN KEUPAYAAN ZETA

Analisis kepoliserakan telah direkodkan menggunakan mod penyerakan cahaya dinamik (DLS) pada perisian Particle Solutions v.3.6.0.7122 (NanoBrook Omni, Brookhaven Instrument Corporation, Amerika Syarikat). Sebanyak 100 µL sampel ditambah ke dalam 2 mL air suling dan disonikasi selama 5 min sebelum bacaan diambil untuk meminimumkan kesan agregasi. Analisis dijalankan pada 25 °C, sudut 90° selama 5 minit.

Keupayaan Zeta pula diukur menggunakan analisis fasa penyerakan cahaya (PALS) menggunakan perisian yang sama pada 25 °C. Kesemua sampel telah disonikasi selama 5 min sebelum pengukuran keupayaan Zeta dilakukan.

Sebanyak 0.010 g sampel dalam 1 mL air suling digunakan bagi setiap analisis. Bagi setiap analisis, sebanyak tiga replikasi bacaan telah diambil. Air suling yang digunakan ditapis sebanyak dua kali menggunakan penapis picagari 0.45 µm (Whatman).

UJIAN FOTOMANGKIN

Aktiviti fotomangkin dinilai melalui degradasi metilena biru (MB) di bawah nyalaan dua lampu UV (13 watts, $\lambda = 254$ nm). Sebanyak 40 mg sampel diampai dalam 100 mL larutan akueus MB yang berkepekatan 5 mg/L. Larutan dikacau secara magnetik selama 45 min dalam gelap untuk mendapatkan keseimbangan penyerapan-nyahserapan antara MB dan fotomangkin sebelum penyinaran UV dilakukan. Kemudian, sebanyak 1 mL aliquot disampel setiap 5 minit, diempar dan bahagian supernatan diambil untuk direkodkan bacaan penyerapan pada panjang gelombang (λ) 664 nm menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Kesemua langkah ini diulang sehingga bacaan penyerapan menjadi malar. Peratus degradasi MB ditentukan menggunakan formula:

$$\% \text{ Degradasi: } \frac{C_0 - C_1}{C_0} \times 100\%$$

dengan C_0 ialah kepekatan awal larutan MB; dan C_1 ialah kepekatan larutan MB selepas penyinaran UV pada sela masa tertentu.

UJIAN ANTIBAKTERIA

Aktiviti antibakteria terhadap *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* dinilai menggunakan ujian peresapan agar. Satu koloni tunggal bakteria dimasukkan ke dalam kelalang penggoncang yang mengandungi 50 mL kaldu sukrosa kentang. Pertumbuhan dilakukan selama 72 jam pada suhu

30 °C, dengan kadar goncangan 150 rpm. Seterusnya, kaldu diempar pada kelajuan 4000 rpm selama 10 min. Supernatan dibuang dan pelet diampai dalam larutan penimbal fosfat steril, pH 7.2 dan proses pengemparan serta pengampaian pelet diulang sekali lagi. Penyerapan OD bagi bakteria dibaca pada panjang gelombang (λ) 600 nm menggunakan spektrofotometer (Novospec Plus, Amersham Biosciences). Bakteria dengan bacaan 10^6 CFU/mL telah digunakan dalam uji kaji ini.

Sebanyak 100 µL ampai bakteria dititiskan ke atas permukaan agar LB dan diratakan menggunakan putik kapas yang steril. Seterusnya, pengorek gabus yang berdiameter 7 mm digunakan untuk menebuk lubang pada agar tersebut. Sebanyak 50 µL sampel masing-masing pada kepekatan 100, 50, 25, 15, 10 dan 5 mg/mL dimasukkan ke dalam lubang tersebut. 0.1 mg/mL amfisilin digunakan sebagai kawalan positif manakala air suling steril sebagai kawalan negatif. Kesemua agar dieram pada suhu 30 °C selama 72 jam.

UJIAN KETOKSIKAN IKAN ZEBRA (*Danio rerio*)

Ujian ketoksikan ikan zebra telah dijalankan oleh Danio Assay Laboratories Sdn. Bhd., Fakulti Bioteknologi & Sains Biomolekul, Universiti Putra Malaysia mengikut protokol berikut: Larutan stok sampel ZnO tulen, ZnO yang dikisar 6 jam dan ZnO yang dikisar 12 jam pada kepekatan 500 mg/mL telah disediakan dalam air suling. Larutan stok ini kemudiannya dicairkan dalam media embrio (larutan Danio-SprintM) bagi mendapatkan kepekatan antara 7.81-500 mg/mL dalam plat mikro 96 telaga. Embrio dalam media embrio yang tidak dirawat dengan mana-mana larutan ZnO tulen, ZnO yang dikisar 6 jam dan ZnO yang dikisar 12 jam digunakan sebagai kawalan negatif.

Ujian ketoksikan embrio ikan zebra (ZFET) telah dijalankan berdasarkan garis panduan Organisasi untuk Kerjasama dan Pembangunan Ekonomi (OECD) untuk ujian ketoksikan embrio ikan (FET) (OECD 2013). Secara ringkas, embrio ikan zebra (satu embrio/telaga) pada usia <12 jam selepas persenyawaan (hpf) didedahkan kepada sampel (200 µL) dalam plat mikro 96 telaga pada tujuh kepekatan berbeza antara 7.81-500 mg/mL. Uji kaji telah dijalankan dengan 12 replikasi (12 embrio) untuk setiap kepekatan termasuk kumpulan negatif. Embrio yang dirawat dengan bahan nano dieram pada suhu bilik (25-28 °C) selama 5 hari. Kematian kumulatif dan kecacatan perkembangan embrio dan larva diperhatikan dan ditentukan setiap 24 jam dari 0-120 jam hpf. Kadar kemandirian, kadar penetasan, kadar

denyutan jantung, kecacatan morfologi atau kecacatan teratogenik diperhatikan dan imej/video diambil/dirakam menggunakan mikroskop terbalik yang dipasang dengan kamera digital. Degupan jantung dihitung daripada tiga embrio terpilih menggunakan jam randik selama 1 minit manakala tiga larva daripada setiap rawatan telah dipilih secara rawak untuk penilaian kardiotoksikiti. Untuk menghalang larva daripada bergerak, ia telah didepositkan pada slaid kaca berongga yang disalut dengan 3.5% metilselulosa. Mikroskop terbalik (Nikon ELWD 0.3/OD75) digunakan untuk merakam video pada pembesaran 40X dan perisian Danio Scope v1.1 (Noldus Information Technology, Belanda) digunakan untuk analisis degupan jantung. Titik akhir maut dicirikan oleh pembekuan dan ketiadaan degupan jantung. Anomali perkembangan termasuk edema perikardial, edema kantung kuning telur, tidak menetas, badan melengkung dan ekor bengkok dinilai setiap hari antara 24 dan 120 hpf selepas persenyawaan dalam kesemua sampel 12 larva daripada setiap kumpulan rawatan. Kesemua imej diambil menggunakan mikroskop terbalik (Nikon Eclipse TS100) dan kamera (Nikon ELWD 0.3/OD75) pada pembesaran 40X.

Dos maut pada 50% (LC_{50}) embrio ikan zebra yang dirawat dengan bahan nano juga diukur menggunakan perisian yang sama. Kadar denyutan jantung ditunjukkan sebagai min \pm ralat piawai min (S.E.M) daripada tiga haiwan berbeza. Analisis varians sehalu (ANOVA) digunakan untuk menjalankan perbezaan yang signifikan dengan ujian post hoc menggunakan Dunnett's Multiple Comparison. Sesuatu data dianggap signifikan pada $*P < 0.05$, $**P < 0.01$ dan $***P < 0.001$ antara kumpulan yang dirawat berbanding dengan embrio dalam media embrio sahaja (tidak dirawat).

HASIL DAN PERBINCANGAN

PENCIRIAN ZnO

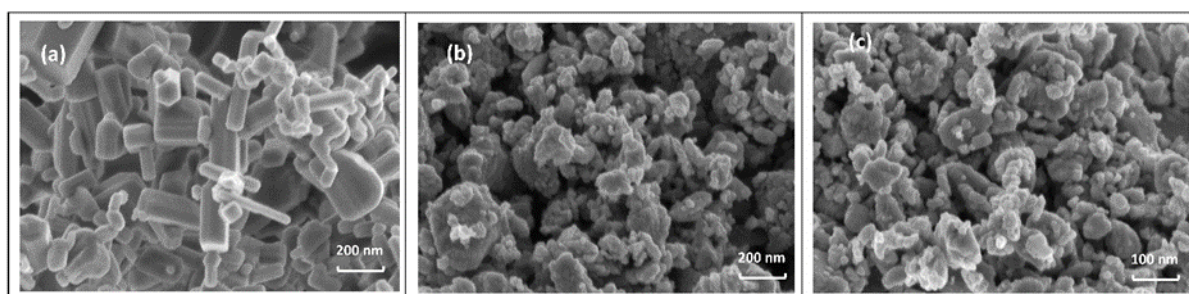
Analisis FESEM menunjukkan bahawa ZnO NP tulen terdiri daripada zarah berbentuk tidak sekata. Didapati juga zarah ZnO lebih bercenderung untuk membentuk dan menjadi agregat tidak sekata kesan daya tarikan van der Waals selepas proses pengisaran bebola seperti yang ditunjukkan dalam Rajah 1. Ini mungkin disebabkan oleh luas permukaan zarah yang menjadi lebih besar selepas pengisaran.

Imej TEM untuk sampel ZnO sebelum dan selepas proses pengisaran bebola ditunjukkan dalam Rajah 2. Serbuk ZnO tulen didapati bersaiz dalam lingkungan

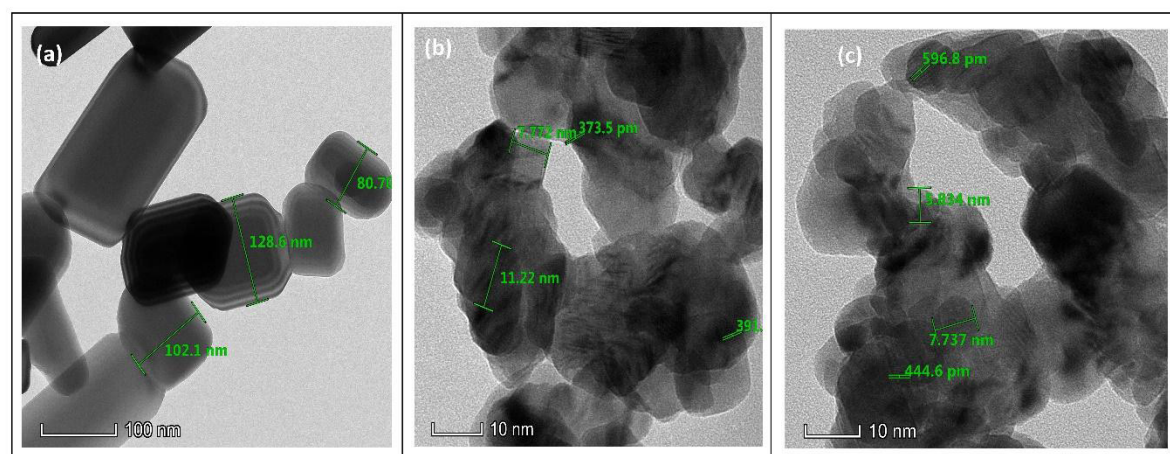
100 nm manakala sampel yang dikisar selama 6 jam terdiri daripada zarah bersaiz dalam julat 7-12 nm. Bagi serbuk ZnO yang dikisar selama 12 jam pula, saiz zarah didapati menjadi semakin kecil dan berada di dalam julat 5-7 nm. Ini menunjukkan saiz zarah ZnO berkurangan secara berterusan dengan masa pengisaran sehingga mencapai kira-kira 93% daripada saiz asalnya selepas 6 jam. Imej-imej ini menunjukkan saiz zarah ultrahalus pada skala besar boleh dicapai melalui proses yang mudah dan ringkas seperti proses pengisaran bebola.

Indeks kepoliserakan memberi gambaran tentang taburan saiz dan kehomogenan ZnO. Analisis kepoliserakan menunjukkan ZnO tulen, ZnO yang dikisar selama 6 dan 12 jam masing-masing mempunyai indeks kepoliserakan sebanyak 0.250, 0.235 dan 0.216 (Jadual 1). Istilah kepoliserakan digunakan untuk menggambarkan tahap ketidakseragaman taburan saiz zarah. Menurut Danaei et al. (2018), nilai kepoliserakan sampel yang melebihi 0.7 menunjukkan sampel berkenaan mempunyai taburan saiz zarah yang luas. Nilai kepoliserakan bagi ketiga-tiga sampel didapati kurang daripada 0.3. Ini menunjukkan sampel tersebut mempunyai taburan saiz yang agak sekata. DLS menggunakan prinsip penyerakan cahaya dinamik dalam pengukuran saiz dan potensi Zeta nanozarah yang tersebar dalam cecair. Berbanding TEM, DLS berupaya mengukur bilangan zarah yang lebih besar (dalam berjuta-juta). Sebaliknya, TEM mengukur permukaan unjuran sampel berdasarkan bilangan elektron yang melaluinya. Oleh itu, purata saiz zarah yang ditentukan oleh DLS biasanya jauh lebih besar daripada yang ditentukan oleh TEM. Seperti yang dapat dilihat dalam Jadual 1, purata diameter zarah ZnO berkurangan dengan peningkatan masa pengisaran.

Keupayaan Zeta dapat memberi gambaran terperinci mengenai kestabilan zarah koloid dan potensi pengagregatan/flokulasi. Kestabilan ini amat sensitif kepada struktur ion dan elektrik antara muka zarah-cecair. Keupayaan Zeta mengukur magnitud tolakan/tarikan elektrostatik antara zarah pada antara muka zarah-cecair. Menurut Mandzy, Grulke dan Druffel (2005), zarah cenderung menggumpal dalam serakan dengan nilai keupayaan Zeta adalah hampir kepada sifar (titik isoelektrik). Namun, pada nilai keupayaan Zeta yang positif atau negatif (lebih daripada 30 mV atau kurang daripada -30 mV), zarah dalam serakan cenderung tolak-menolak antara satu sama lain, menandakan tiada aglomerasi berlaku. Keupayaan Zeta bagi ZnO tulen yang diukur ialah 20.15 mV manakala ZnO yang dikisar



RAJAH 1. Imej FESEM serbuk ZnO (a) ZnO tulen, (b) ZnO yang dikisar 6 jam dan (c) ZnO yang dikisar selama 12 jam



RAJAH 2. Mikrograf TEM bagi sampel (a) ZnO tulen, (b) ZnO yang dikisar 6 jam dan (c) ZnO yang dikisar selama 12 jam

selama 6 jam dan 12 jam masing-masing adalah 21.45 mV dan 20.61 mV (Jadual 2). Menurut garis panduan untuk pengelasan penyebaran nanozarah oleh Serrano et al. (2004), $\pm 0-10$ mV, sangat tidak stabil; $\pm 10-20$ mV: agak stabil; $\pm 20-30$ mV: sederhana stabil; dan $> \pm 30$ mV: sangat stabil, boleh dikatakan kesemua sampel ZnO adalah sederhana stabil.

Analisis XRD menunjukkan puncak difraksi sampel ZnO tulen terletak pada $2\theta = 34.49^\circ$, 36.150° , 47.60° dan 56.20° yang berpadanan dengan struktur hablur ZnO wurtzite heksagon (PDF-01-080-0075) (Rajah 3). Puncak difraksi utama bagi sampel ZnO yang dikisar selama 6

dan 12 jam pula dikesan pada $2\theta = 36.23^\circ$, 31.75° dan 34.42° . Ketiga-tiga puncak difraksi ini merujuk kepada satah (101), (100) dan (002) yang berpadanan dengan struktur hablur wurtzite heksagon padat rapat (PDF 01-078-3322). Dapat diperhatikan daripada Rajah 3, peningkatan masa pengisaran telah melebarkan puncak difraksi dan mengurangkan keamatannya secara beransur-ansur. Ini menandakan pengurangan saiz zarah ZnO dan kecacatan kekisi oleh tenaga mekanikal daripada proses pengisaran telah berlaku. Selain itu, tiada peralihan fasa diperhatikan selepas proses pengisaran bebola. Dari segi saiz hablur pula, didapati ZnO tulen mempunyai purata

saiz hablur 36.5 nm diikuti oleh 14.3 nm bagi ZnO yang dikisar selama 6 jam dan 13.2 nm bagi ZnO yang dikisar selama 12 jam.

Analisis UV-Vis ZnO menunjukkan pembentukan puncak kecil dalam julat 375-380 nm (Rajah 4). Puncak

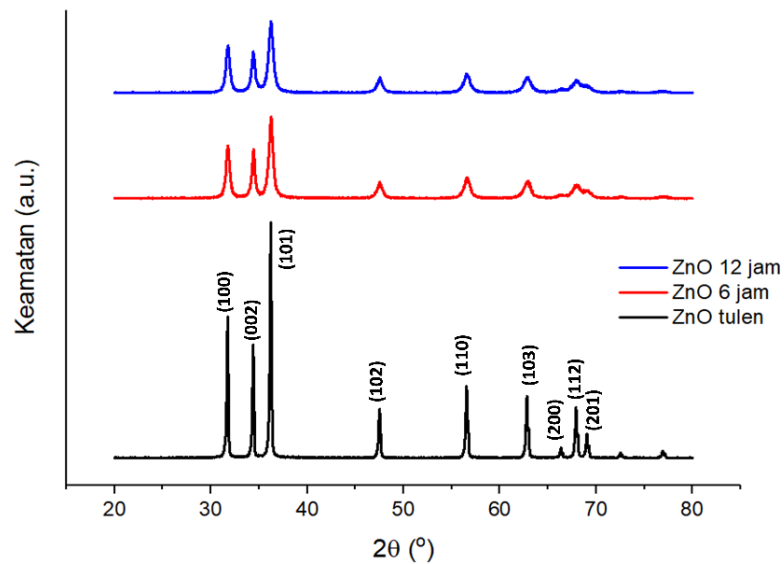
penyerapan ZnO tulen terbentuk pada 380 nm manakala puncak penyerapan ZnO yang dikisar selama 6 jam dan 12 jam terbentuk pada 375 nm.

JADUAL 1. Indeks kepoliserakan dan purata diameter sampel ZnO tulen dan yang dikisar selama 6 dan 12 jam

Sampel	Purata diameter (nm)	Kepoliserakan
ZnO	964.43	0.250
ZnO dikisar selama 6 jam	860.23	0.235
ZnO dikisar selama 12 jam	389.99	0.216

JADUAL 2. Purata bacaan potensi Zeta bagi sampel ZnO tulen dan dikisar selama 6 dan 12 jam

Sampel	Purata bacaan Zeta (mV)
ZnO	20.15
ZnO dikisar selama 6 jam	21.45
ZnO dikisar selama 12 jam	20.61



RAJAH 3. Difraktogram untuk ZnO sebelum dan selepas proses pengisaran selama 6 dan 12 jam

FOTOMANGKIN

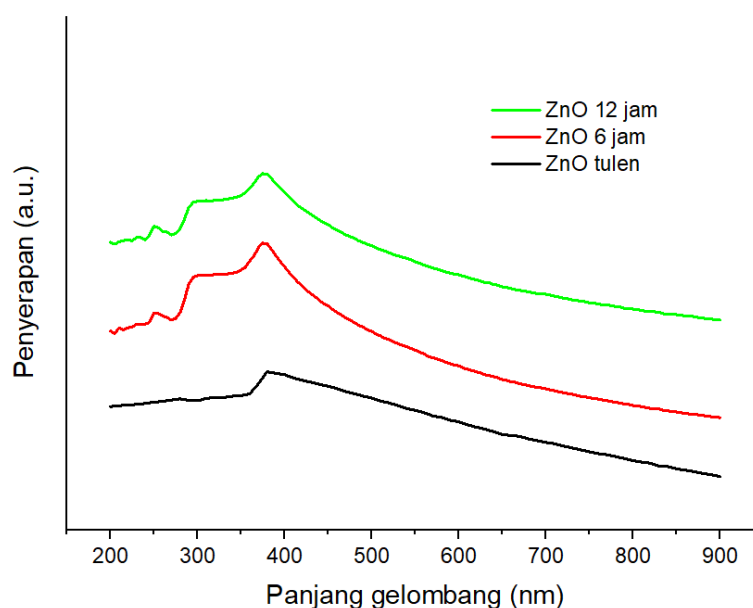
Keefisienan degradasi MB pada fasa gelap oleh ZnO tulen adalah sebanyak 0.8% diikuti oleh ZnO dengan masa pengisaran bebola 12 jam sebanyak 3.4% dan ZnO dengan masa pengisaran bebola 6 jam sebanyak 0.6% (Rajah 5). Namun, setelah diberi pendedahan kepada sinaran UV, keefisienan sampel mendegradasi MB oleh ZnO tulen menjadi 54.8% sebelum menjadi malar 45 minit selepas pendedahan kepada sinar UV. Ini diikuti oleh ZnO dengan masa pengisaran bebola 12 jam sebanyak 3.8% dan ZnO dengan masa pengisaran bebola 6 jam sebanyak 3.4%. Kedua-dua sampel ini didapati masih lagi mendegradasi MB 75 minit selepas pendedahan kepada sinar UV.

Dapat diperhatikan bahawa kesemua sampel ZnO menunjukkan aktiviti fotomangkin yang rendah pada fasa gelap tetapi meningkat sedikit demi sedikit setelah diberi pendedahan kepada sinar UV. Keberkesanan bahan fotomangkin boleh dipengaruhi oleh beberapa faktor seperti kehabluran, komposisi fasa, saiz zarah dan luas permukaan (Singh et al. 2023). Secara umumnya, proses pengisaran bebola menyebabkan saiz zarah ZnO menjadi semakin kecil dan seterusnya menambah luas permukaannya. Luas permukaan mangkin yang lebih besar adalah lebih baik bagi aktiviti fotomangkin kerana ia meningkatkan sentuhan antara pemangkin

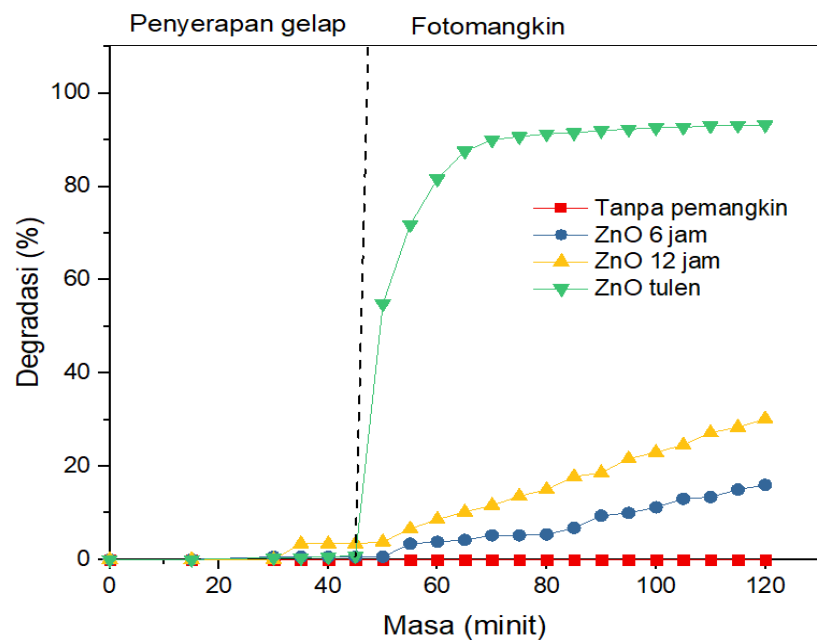
dan molekul pewarna. Tetapi pada masa yang sama, proses ini turut meningkatkan kecacatan yang diaruh oleh pengurangan saiz zarah lalu mengurangkan proses penggabungan semula elektron-lohong yang diperlukan untuk memulakan tindak balas fotomangkin. Ini akan mengakibatkan aktiviti fotomangkin nanozarah menjadi rendah (Raha & Ahmaruzzaman 2022). Ini ditunjukkan melalui kajian ini yang mendapati aktiviti fotomangkin semua sampel ZnO yang dikisar adalah lebih rendah berbanding ZnO tulen. Walau bagaimanapun, bagi sampel yang dikisar, saiz zarah ZnO yang dikisar 12 jam adalah lebih kecil berbanding saiz zarah ZnO yang dikisar 6 jam. Kecekapan degradasi ZnO 12 jam juga lebih tinggi daripada ZnO yang dikisar 6 jam. Ini membuktikan saiz zarah ZnO memainkan peranan dalam kecekapan degradasi MB. Penemuan ini turut dilaporkan oleh beberapa penyelidik yang lain (Hendrix et al. 2023; Kusiak-Nejman et al. 2021).

ANTIBAKTERIA

Pertumbuhan *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* dapat dikawal oleh ZnO tulen dan ZnO yang dikisar seperti yang ditunjukkan dalam Rajah 6. Daripada Rajah 6, didapati diameter zon perencatan yang tertinggi direkodkan oleh ZnO tulen pada kepekatan 100 mg/mL iaitu 2.7



RAJAH 4. Spektrum penyerapan UV-Vis ZnO sebelum dan selepas proses pengisaran selama 6 dan 12 jam



RAJAH 5. Degradasi metilena biru oleh ZnO tulen dan yang dikisar selama 6 dan 12 jam

cm \pm 0.21. Ini diikuti oleh kepekatan 50, 25, 15, 10 dan 5 mg/mL. Bagi ZnO yang dikisar 6 jam pula, zon perencatan tertinggi direkodkan oleh kepekatan 100 mg/mL dengan diameter perencatan sebanyak 2.4 cm \pm 0.05. Zon perencatan ini juga diperhatikan pada kepekatan yang lain namun tiada zon perencatan direkodkan pada kepekatan 5 mg/mL. Trend yang sama juga diperhatikan pada ZnO yang dikisar selama 12 jam. Diameter zon perencatan tertinggi direkodkan pada kepekatan 100 mg/mL dan diikuti oleh kepekatan lain tetapi tiada zon perencatan yang terbentuk pada kepekatan 10 dan 5 mg/mL. Kawalan positif amfisisilin 0.1 mg/mL pula memberikan diameter zon perencatan sebanyak 3.5 cm \pm 0.31 manakala tiada zon perencatan direkodkan pada air suling sebagai kawalan negatif. Aktiviti antibakteria ZnO dipengaruhi oleh pelbagai faktor seperti saiz zarah, morfologi dan jenis bakteria yang digunakan (Gudkov et al. 2021). Dalam penentuan aktiviti antibakteria ini, pembentukan zon perencatan didapati bergantung kepada dos dengan zon perencatan yang terbesar direkodkan oleh kepekatan ZnO yang tertinggi.

Pada masa yang sama juga, saiz ZnO yang semakin mengecil tidak memberikan kesan perencatan yang lebih tinggi. Saiz zarah yang kecil dikaitkan dengan

aktiviti antibakteria yang tinggi kerana luas permukaan nanozarah yang bersentuhan dengan membran bakteria semakin bertambah. Peningkatan sentuhan ini turut menambah pembebasan ion Zn²⁺ yang terlibat dalam mekanisme antibakteria daripada ZnO sekali gus meningkatkan aktiviti antibakteria. Namun, saiz zarah yang kecil juga mempunyai kecenderungan tinggi untuk beraglomerasi oleh daya tarikan van der Waals. Aglomerasi akan mengurangkan luas permukaan dan kereaktifan sesuatu bahan nano (Pauzi, Zain & Yusof 2020). Hasil penentuan keupayaan Zeta menunjukkan ZnO berpotensi untuk beraglomerasi dan keadaan ini mungkin mengurangkan kesensitifannya sebagai bahan antimikrob.

Imej FESEM ZnO (Rajah 1) menunjukkan ZnO tulen berbentuk rod heksagon sebelum berubah menjadi agregat tidak sekata selepas proses pengisaran bebola. Perubahan morfologi ini mungkin mempengaruhi respons antibakteria yang dijelaskan dari segi faset aktif pada ZnO. Menurut Pal, Tak dan Song (2007), teknik yang digunakan dalam sintesis bahan nano mempengaruhi penghasilan faset aktif pada bahan nano tersebut. Sebagai contoh, struktur rod nano ZnO mempunyai faset (111) dan (100) manakala struktur

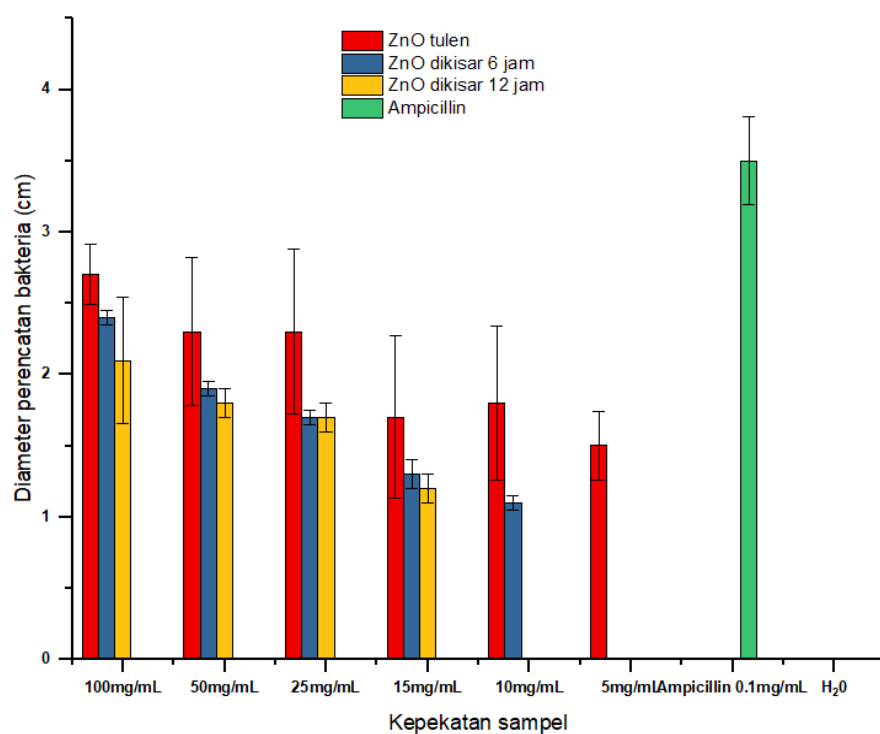
nano sfera mempunyai faset (100). Faset berketumpatan atom tinggi iaitu faset (111) menunjukkan aktiviti antibakteria yang lebih tinggi berbanding faset lain. Pengaruh faset pada aktiviti antibakteria ZnO telah dinilai oleh beberapa kajian dan kesimpulan daripada kajian tersebut mengatakan ZnO dengan morfologi yang berbeza mempunyai faset aktif yang berbeza dan secara tidak langsung memberikan kesan antibakteria yang berbeza (Ramani et al. 2014).

UJIAN KETOKSIKAN IKAN ZEBRA (ZFET)

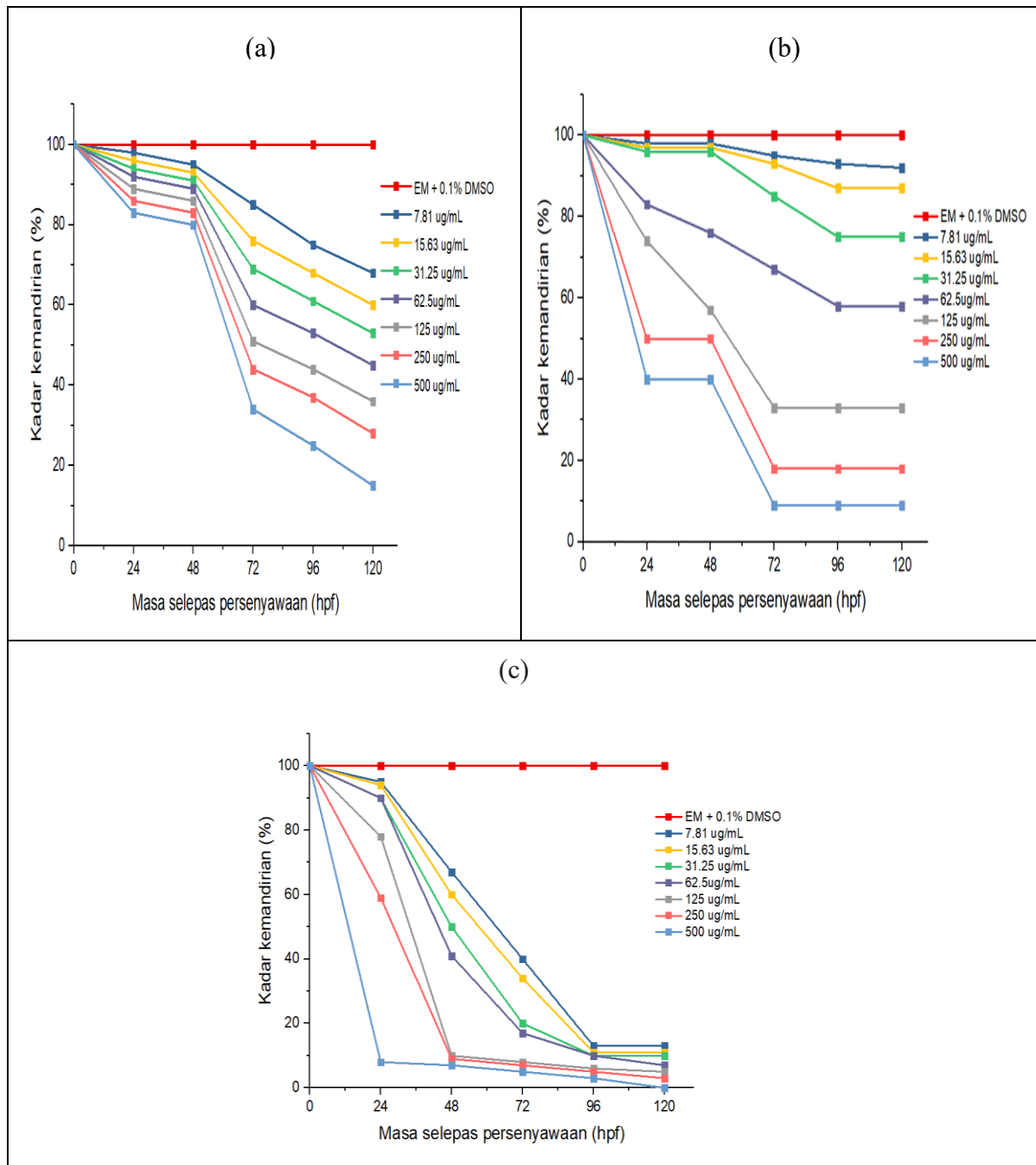
Ujian ZFET ialah ujian haiwan alternatif yang sah untuk menilai risiko pencemar alam sekitar untuk kesihatan haiwan dan manusia (Chahardehi, Arsad & Lim 2020). Dalam kajian ini, ketoksikan ZnO NP tulen dan yang dikisar selama 6 dan 12 jam telah dinilai secara *in vivo* menggunakan embrio ikan zebra. Ketoksikan diukur melalui parameter seperti kadar kemandirian, kadar penetasan, kadar denyutan jantung dan kecacatan teratogenik.

Bagi sampel ZnO NP tulen, kemandirian embrio ikan zebra mula menurun dengan pertambahan masa

selepas persenyawaan (hpf) untuk semua kepekatan yang diuji (Rajah 7(a)-7(c)). Kepekatan 500 mg/mL mencatatkan kemandirian terendah diikuti oleh kepekatan lain. Walau bagaimanapun, kemandirian embrio ikan zebra pada kepekatan 7.81-31.25 mg/mL didapati masih melebihi 50% pada 120 hpf. Kemandirian embrio ikan zebra bagi sampel ZnO NP yang dikisar 6 jam pada kepekatan 250-500 mg/mL menjunam bawah 20% selepas 72 hpf manakala pada kepekatan 125 mg/mL, kemandirian embrio ikan zebra menurun secara berterusan dan menjadi malar 72 hpf. Pada kepekatan 15.63-62.5 mg/mL, kemandirian embrio ikan zebra menunjukkan penurunan sebelum malar pada 96 hpf (Rajah 7(b)). Sebaliknya, kemandirian embrio ikan zebra pada kepekatan 7.81 mg/mL kekal melebihi 90% sepanjang 120 hpf. Sampel ZnO NP yang dikisar 12 jam menunjukkan gejala ketoksikan akut paling tinggi apabila kemandirian embrio ikan zebra pada kepekatan 500 mg/mL kurang 10% selepas 24 hpf (Rajah 7(c)). Trend penurunan ini turut diperhatikan pada kepekatan lain dengan kadar kemandirian mulai menurun bermula 48 hpf. Turut diperhatikan kadar kemandirian berada



RAJAH 6. Zon perencatan pertumbuhan *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* oleh ZnO tulen dan yang dikisar selama 6 dan 12 jam



RAJAH 7. Kadar kemandirian embrio ikan zebra pada 0 hingga 120 jam selepas persenyawaan (hpf) selepas diuji dengan (a) ZnO NP tulan, (b) ZnO NP dikisar 6 jam dan (c) ZnO NP dikisar 12 jam pada kepekatan 7.81-500 µg/mL

di bawah 20% bagi semua kepekatan pada 120 selepas persenyawaan (hpf). Nilai LC_{50} bagi ZnO NP tulan, ZnO NP yang dikisar 6 jam dan ZnO NP yang dikisar 12

jam adalah masing-masing sebanyak 31.67, 78.09 dan 1.04 mg/mL. Menurut El Harbawy (2014), nilai LC_{50} 31.67 dan 78.09 mg/mL adalah sedikit toksik manakala

nilai LC_{50} 1.04 mg/mL adalah sederhana toksik. Skala penilaian ketoksikan ini adalah seperti yang ditunjukkan dalam Jadual 3.

Daripada ketiga-tiga sampel yang diuji, didapati nilai LC_{50} bagi sampel ZnO NP dikisar 12 jam adalah yang terendah. Ketoksikan bahan nano kepada organisma biasanya dikaitkan dengan saiznya yang kecil yang boleh melepasi membran sel. Namun, ketoksikan ZnO NP juga dikaitkan dengan keupayaannya untuk membebaskan ion dalam larutan neutral. ZnO NP mendorong pembebasan ion Zn^{2+} intrasel yang membawa kepada penjaan ROS intrasel secara berlebihan, kebocoran membran plasma, disfungsi mitokondria dan akhirnya kematian sel (Fasil et al. 2021). Pelepasan ion ini lebih mudah berlaku pada bahan nano berbanding bahan yang bersaiz lebih besar. Ini kerana bahan nano mempunyai keluasan permukaan dan kereaktifan permukaan yang tinggi (Ifijen, Maliki & Anegebe 2022). Oleh itu, ketoksikan ZnO NP yang dikisar 12 jam mungkin disebabkan oleh saiznya yang paling kecil berbanding sampel lain.

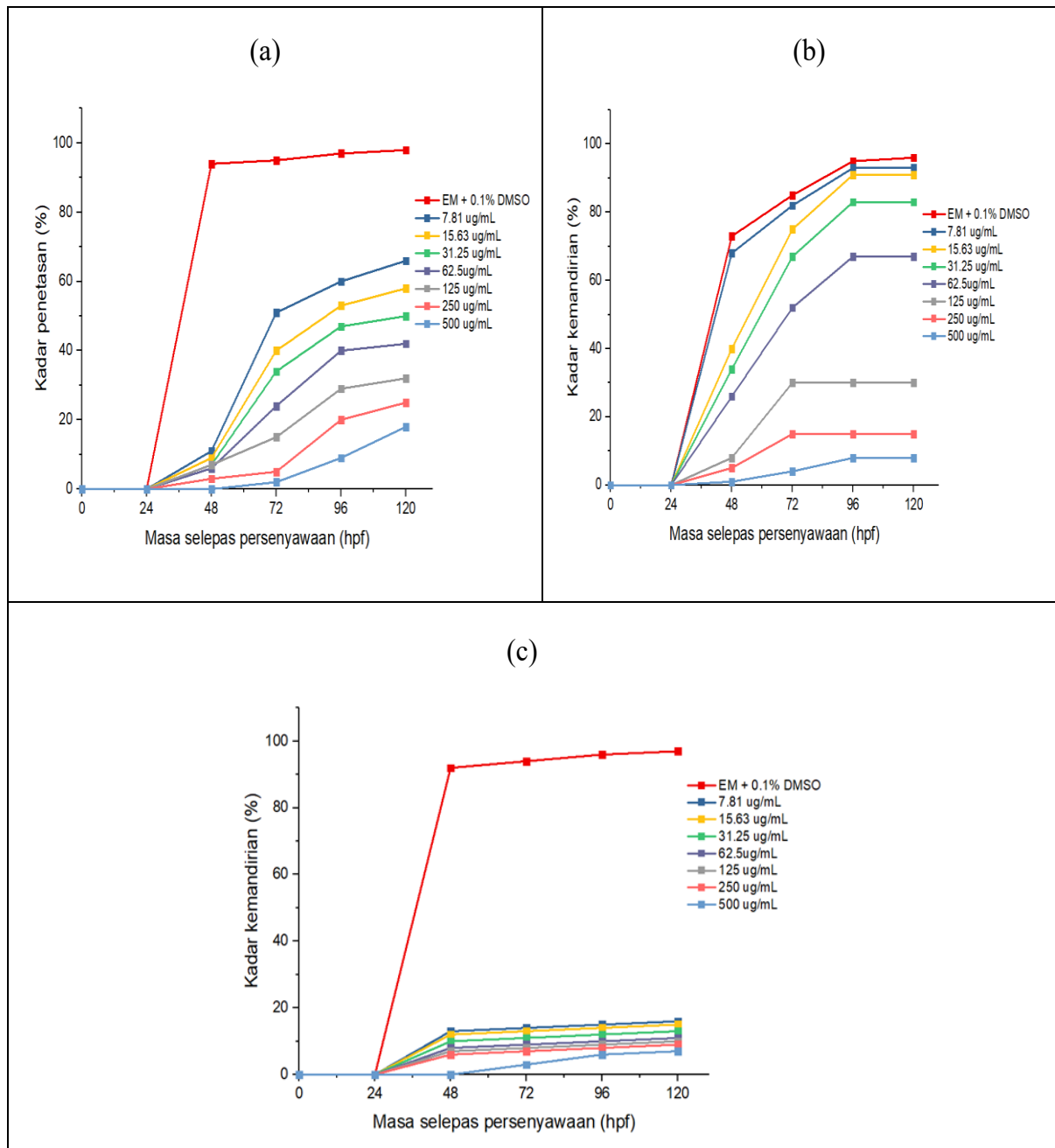
Kajian penetasan embrio ikan zebra mendapati ZnO NP tulen dan ZnO NP dikisar 6 jam tidak menyebabkan kelewatan pada penetasan (Rajah 8(a)-8(c)). Sebaliknya, ZnO NP dikisar 12 jam didapati mengakibatkan kelewatan penetasan embrio ikan zebra (Rajah 8(c)) dengan embrio masih tidak menetas selepas 48 jam. Selain itu, kadar penetasan juga dipengaruhi oleh peningkatan kepekatan ZnO NP dan kadar penetasan semakin berkurang dengan peningkatan kepekatan bagi ketiga-tiga sampel. Ini dapat diperhatikan apabila kadar penetasan sampel ZnO NP tulen dan ZnO NP yang dikisar 6 jam pada kepekatan 500 mg/mL adalah yang terendah (<20%) pada 120 hpf. Manakala, bagi sampel yang dikisar 12 jam, kesemua kepekatan menyebabkan

kelewatan penetasan. Ini menunjukkan kadar penetasan embrio ikan zebra dipengaruhi oleh kepekatan sampel dan masa pengisaran. Mengikut piawaian, embrio ikan zebra biasanya menetas antara 48 dan 72 jam hpf (Abdullah et al. 2022). Menurut Verma et al. (2017), nanozarah memasuki liang korion lalu merencat enzim penetasan yang dihasilkan oleh kelenjar penetasan dalam kantung korion. Semasa proses penetasan normal, enzim penetasan mencerna korion untuk perkembangan embrio. Nanozarah juga boleh menyekat liang korion lalu menyebabkan kekurangan bekalan oksigen yang penting untuk perkembangan embrio. Perencatan enzim penetasan ini dipengaruhi oleh saiz bahan nano dengan saiz bahan yang lebih kecil akan memberikan perencatan yang lebih tinggi. Justeru, penetasan tertunda dengan sampel ZnO NP dikisar 12 jam boleh dikaitkan dengan peningkatan perencatan enzim penetasan akibat pengurangan saiz ZnO yang disebabkan oleh masa pengisaran yang lebih lama.

Bacaan kadar degupan jantung embrio ikan zebra diambil pada 96 hpf dan didapati kadar denyutan jantung berkurangan dengan pertambahan kepekatan dan juga masa pengisaran. Kadar degupan jantung untuk sampel ZnO NP tulen menunjukkan perbezaan signifikan pada bacaan kepekatan tertinggi 500 mg/mL berbanding kumpulan kawalan ($P < 0.001$) (Rajah 9). Kadar degupan jantung pada kepekatan tersebut adalah perlahan 101.33 ± 6.11 denyutan min^{-1} (> 500 mg/mL). Bagi sampel ZnO NP yang dikisar 6 jam, kadar degupan jantung bagi kepekatan melebihi 125 mg/mL tidak dapat ditentukan kerana kadar kematian embrio ikan zebra yang tinggi ($> 60\%$). Kadar degupan jantung yang perlahan dapat diperhatikan 112 ± 8.00 denyutan min^{-1} (> 62.5 mg/mL). Bacaan kadar degupan jantung bagi sampel tersebut didapati menurun dengan peningkatan kepekatan sampel.

JADUAL 3. Skala penilaian ketoksikan (El Harbawy 2014)

Ketoksikan relatif	Akuatik LC_{50} (mg/L)
Super toksik	0.01-0.1
Sangat toksik	0.1-1
Sederhana toksik	1-10
Sedikit toksik	10-100
Boleh dikatakan toksik	100-1000
Agak tidak memudaratkan	> 1000



RAJAH 8. Kadar penetasan embrio ikan zebra dari 24 hingga 120 hpf selepas diuji dengan (a) ZnO NP tulen, (b) ZnO NP dikisar 6 jam dan (c) ZnO NP dikisar 12 jam pada kepekatan 7.81-500 mg/mL

Bacaan pada kepekatan 62.5 mg/mL mencatatkan perbezaan signifikan ($P < 0.01$) berbanding kumpulan kawalan. Kadar degupan jantung embrio ikan zebra

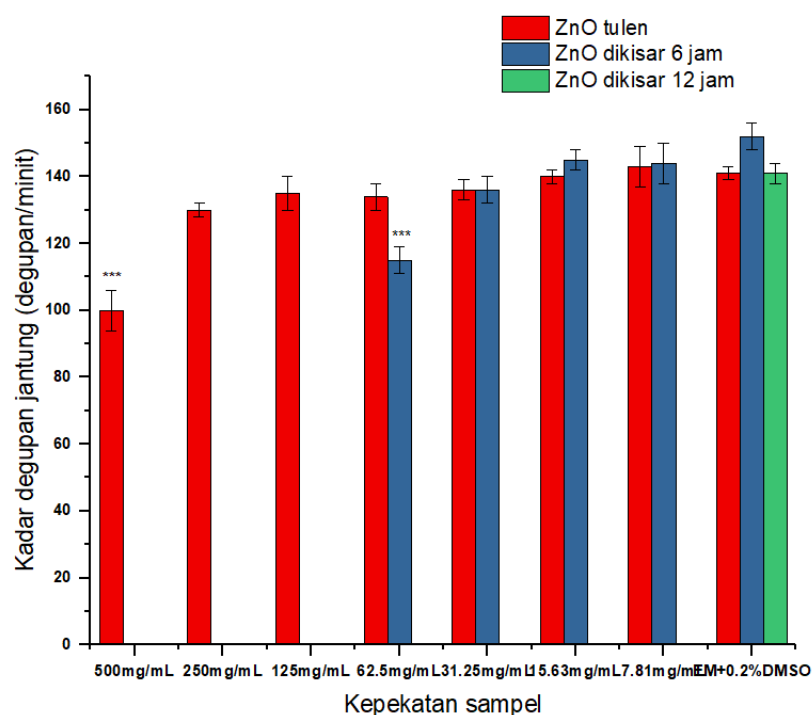
pada kepekatan melebihi 7.81 mg/mL bagi sampel ZnO NP dikisar 12 jam tidak dapat ditentukan kerana kadar kematian embrio ikan zebra yang tinggi ($> 80\%$).

Kadar kematian embrio yang tinggi juga menyebabkan kadar degupan jantung tidak dapat ditentukan. Jantung adalah organ pertama yang membentuk dan berfungsi semasa embriogenesis. Kadar denyutan jantung boleh digunakan sebagai penunjuk untuk menilai fungsi jantung embrio (Bangeppagari et al. 2018). Menurut Panda et al. (2022) kadar denyutan jantung yang tidak normal bagi embrio adalah disebabkan oleh hipoksia yang terjadi akibat penyumbatan liang korion oleh nanozarah di permukaannya. Kajian oleh Verma et al. (2017) juga menunjukkan kadar degupan jantung embrio ikan zebra dipengaruhi oleh kepekatan dan masa pengisaran ZnO.

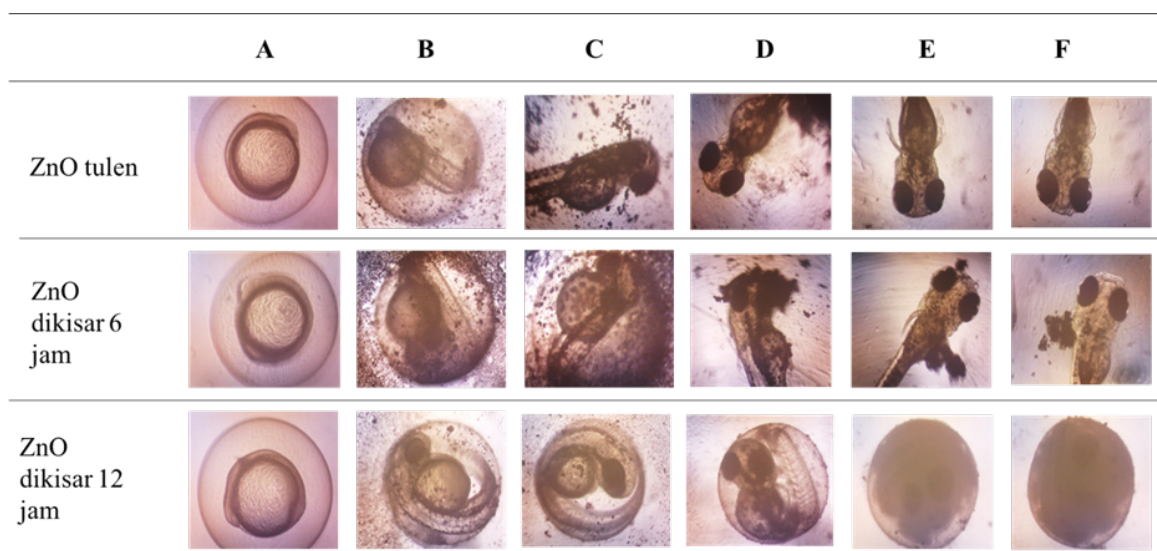
Embrio ikan zebra telah didedahkan kepada ZnO NP tulen dan dikisar pada kepekatan 7.81 mg/mL selama 120 jam. Tiada perkembangan abnormal embrio ikan zebra yang diperhatikan pada kumpulan ZnO NP tulen dan ZnO NP dikisar 6 jam (Rajah 10(a)-10(b)). Walau

bagaimanapun, pendedahan kepada sampel ZnO NP dikisar 12 jam mengakibatkan edema kantung kuning telur embrio ikan zebra seperti yang ditunjukkan dalam Rajah 10(c). Kecacatan ini mengakibatkan kematian embrio pada 96 hpf.

Penemuan ini adalah selaras dengan kajian oleh Verma et al. (2017) yang mendapati ZnO yang dikisar selama 10 jam menyebabkan kecacatan morfologi yang lebih serius kepada embrio ikan zebra berbanding ZnO yang dikisar 7 jam. Menurut Lee et al. (2022), kecacatan ini mungkin disebabkan oleh gabungan kesan ion Zn^{2+} dan pengumpulan serta interaksi nanozarah dengan selaput luar, kulit dan cecair tubuh embrio ikan zebra. Hasil penemuan ini juga secara tidak langsung menunjukkan hubungan kait antara saiz ZnO NP dengan perkembangan embrio ikan zebra di mana saiz ZnO NP yang lebih kecil adalah toksik kepada perkembangan embrio.



RAJAH 9. Kesan sampel nanozarah ZnO tulen dan dikisar pada kepekatan 7.81-500 mg/mL terhadap kadar degupan jantung embrio ikan zebra 96 jam selepas persenyawaan (hpf) Perbezaan signifikan pada *** $P < 0.001$ antara cara kumpulan yang dirawat berbanding dengan yang tidak dirawat



RAJAH 10. Imej perkembangan embrio dan larva ikan zebra pada (a) 0 hpf, (b) 24 hpf, (c) 48 hpf, (d) 72 hpf, (e) 96 hpf dan (f) 120 hpf selepas didedahkan kepada ZnO NP tulen dan dikisar pada kepekatan 7.81 mg/mL. Imej diambil menggunakan mikroskop terbalik pada 100X (a dan b) dan pembesaran 40X (c-f)

KESIMPULAN

Dalam kajian ini, ZnO NP dihasilkan oleh serbuk komersial ZnO secara pengisaran bebola selama 6 dan 12 jam. Analisis UV-Vis, XRD, FESEM, TEM dan Zeta telah digunakan dalam pencirian struktur dan spektrum sampel nanozarah ZnO yang terhasil daripada proses pengisaran. Analisis FESEM menunjukkan pembentukan agregat tidak sekata selepas proses pengisaran bebola. Keputusan TEM menunjukkan pengurangan saiz zarah secara beransur-ansur dengan peningkatan masa pengisaran. Pengukuran Zeta menunjukkan sampel nanozarah ZnO adalah sederhana stabil. Corak XRD nanozarah ZnO menunjukkan fasa tunggal struktur heksagon ZnO wurtzite tanpa sebarang pencemaran. Pengurangan saiz zarah ini juga menyebabkan puncak XRD melebar dan isyaratnya menjadi kurang jelas. XRD juga mengesahkan ketiadaan transformasi fasa. Kecekapan degradasi MB didapati tidak dipengaruhi oleh saiz zarah ZnO NP sama ada tulen atau yang telah dikisar selama 6 dan 12 jam. ZnO NP tulen pada kepekatan tertinggi memberikan zon perencatan *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* yang terbesar diikuti oleh ZnO NP yang dikisar 6 jam dan ZnO NP yang dikisar selama 12 jam. Penilaian ketoksikan dalam embrio ikan zebra menunjukkan kemandirian, penetasan, kadar denyutan jantung dan kecacatan morfologi adalah bergantung

kepada dos, masa pendedahan dan saiz zarah ZnO NP. Hasil kajian mendapati saiz ZnO NP mempengaruhi ketoksikan embrio ikan zebra. Sebaliknya saiz ZnO NP tidak mempengaruhi proses fotomangkin dan ujian antibakteria.

PENGHARGAAN

Kami merakamkan penghargaan kepada Profesor Madya Dr Syahida Ahmad (UPM) atas bantuan tenaga kerja dan analisis data ketoksikan ikan zebra. Penyelidikan ini dibiayai oleh geran GUP-2023-020 Geran Universiti Penyelidikan (GUP).

RUJUKAN

- Abdullah, N.R., Mohd Nasir, M.H., Azizan, N.H., Wan-Mohtar, W.A.A.Q.I. & Sharif, F. 2022. Bioreactor-grown exo- and endo- β -glucan from Malaysian *Ganoderma lucidum*: An *in vitro* and *in vivo* study for potential antidiabetic treatment. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* 10: 960320.
- Al Hallak, M., Verdier, T., Bertron, A., Castelló Lux, K., El Atti, O., Fajerweg, K., Fau, P., Hot, J., Roques, C. & Bailly, J.D. 2023. Comparison of photocatalytic biocidal activity of TiO₂, ZnO and Au/ZnO on *Escherichia coli* and on *Aspergillus niger* under light intensity close to real-life conditions. *Catalysts* 13(7): 1139.

- Altammar, K.A. 2023. A review on nanoparticles: Characteristics, synthesis, applications, and challenges. *Frontiers in Microbiology* 14: 1155622.
- Babayevska, N., Przysiecka, Ł., Iatsunskiy, I., Nowaczyk, G., Jarek, M., Janiszewska, E. & Jurga, S. 2022. ZnO size and shape effect on antibacterial activity and cytotoxicity profile. *Scientific Reports* 12: 8148.
- Bangeppagari, M., Park, S.H., Kim, K.W., Kundapur, R.R. & Lee, S.J. 2018. *In vivo* toxicity evaluation of pristine graphene in developing zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Environmental Science and Pollution Research* 25: 12821-12829.
- Chahardehi, A.M., Arsad, H. & Lim, V.H. 2020. Zebrafish as a successful animal model for screening toxicity of medicinal plants. *Plants* 9(10): 1345.
- Danaei, M., Dehghankhold, M., Ataei, S., Hasanzadeh Davarani, F., Javanmard, R., Dokhani, A., Khorasani, S. & Mozafari, M.R. 2018. Impact of particle size and polydispersity index on the clinical applications of lipidic nanocarrier systems. *Pharmaceutics* 10: 57.
- El Harbawy, M. 2014. Toxicity measurement of imidazolium ionic liquids using acute toxicity test. *Procedia Chemistry* 9: 40-52.
- Fasil, D.M., Hamdi, H., Al-Barty, A., Zaid, A.A., Parashar, S.K.S. & Das, B. 2021. Selenium and zinc oxide multnutrient supplementation enhanced growth performance in zebra fish by modulating oxidative stress and growth-related gene expression. *Frontiers in Bioengineering Biotechnology* 9: 721717.
- Gudkov, S.V., Burmistrov, D.E., Serov, D.A., Rebezov, M.B., Semenova, A.A. & Lisitsyn, A.B. 2021. A mini review of antibacterial properties of ZnO nanoparticles. *Frontiers in Physics* 9: 641481.
- Hendrix, Y., Rauwel, E., Nagpal, K., Haddad, R., Estephan, E., Boissière, C. & Rauwel, P. 2023. Revealing the dependency of dye adsorption and photocatalytic activity of ZnO nanoparticles on their morphology and defect states. *Nanomaterials (Basel)* 13(13): 1998.
- Ifijen, I.H., Maliki, M. & Anegebe, B. 2022. Synthesis, photocatalytic degradation and antibacterial properties of selenium or silver doped zinc oxide nanoparticles: A detailed review. *Open Nano* 8: 100082.
- Kusiak-Nejman, E., Wojnarowicz, J., Morawski, A.W., Narkiewicz, U., Sobczak, K., Gierlotka, S. & Lojkowski, W. 2021. Size-dependent effects of ZnO nanoparticles on the photocatalytic degradation of phenol in a water solution. *Applied Surface Science* 541: 148416.
- Lee, Y.L., Shih, Y.S., Chen, Z.Y., Cheng, F.Y., Lu, J.Y., Wu, Y.H. & Wang, Y.J. 2022. Toxic effects and mechanisms of silver and zinc oxide nanoparticles on zebrafish embryos in aquatic ecosystems. *Nanomaterials* 12(4): 717.
- Mandzy, N., Grulke, E. & Druffel, T. 2015. Breakage of TiO₂ agglomerates in electrostatically stabilized aqueous dispersions. *Powder Technology* 160: 121-126.
- Mansoor, A., Khurshid, Z., Mansoor, E., Khan, M.T., Ratnayake, J. & Jamal, A. 2022. Effect of currently available nanoparticle synthesis routes on their biocompatibility with fibroblast cell lines. *Molecules* 27(20): 6972.
- Matei, E., Şăulean, A.A., Răpă, M., Constandache, A., Predescu, A.M., Coman, G., Berbecaru, A.C. & Predescu, C. 2023. ZnO nanostructured matrix as nexus catalysts for the removal of emerging pollutants. *Environmental Science and Pollution Research* 30: 114779-114821.
- Miliauskienė, J., Brazaitytė, A., Sutulienė, R., Urbutis, M. & Tučkutė, S. 2022. ZnO nanoparticle size-dependent effects on Swiss chard growth and nutritional quality. *Agriculture* 12: 1905.
- Niroumand, U., Negar, F., Ghazal, G., Bahareh, H., Parisa, G. & Soliman, M.S. 2023. The effect of size, morphology and surface properties of mesoporous silica nanoparticles on pharmacokinetic aspects and potential toxicity concerns. *Frontiers in Materials* 10: 1189463.
- Norazalina, S., Che Azurahaman, C.A., Nurul Athikah Adila, Z. & Emmellie, L.A. 2023. Characterization, antibacterial and toxicity evaluation of biosynthesized zinc oxide nanoparticles utilizing *Eleuthine bulbosa* bulb extract. *Sains Malaysiana* 52(10): 2907-2918.
- OECD. 2013. Test No. 236: Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test, *OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2*. Paris: OECD Publishing.
- Panda, P.K., Kumari, P., Patel, P., Samal, S.K., Mishra, S., Tambuwala, M.M., Dutt, A., Hilscherová, K., Mishra, Y.K., Varma, R.S., Suar, M., Ahuja, R. & Verma, S.K. 2022. Molecular nanoinformatics approach assessing the biocompatibility of biogenic silver nanoparticles with channelized intrinsic steatosis and apoptosis. *Green Chemistry* 24: 1190-1210.
- Pal, S., Tak, Y.K. & Song, J.M. 2007. Does the antibacterial activity of silver nanoparticles depend on the shape of the nanoparticle? A study of the gram-negative bacterium *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology* 73(6): 1712-1720.
- Palos, C.M.M., Mariño-Gómez, A.E., Acosta-González, G.E., Hernández, M.B., García-Villarreal, S., Franco, L.F., García-Ortiz, L. & Aguilar-Martínez, J.A. 2023. Large-scale production of ZnO nanoparticles by high energy ball milling. *Physica B: Condensed Matter*. 656: 414776.
- Pauzi, N., Zain, N.M. & Yusof, N.A.A. 2020. Gum arabic as natural stabilizing agent in green synthesis of ZnO nanofluids for antibacterial application. *Journal of Environmental Chemical Engineering* 8(3): 103331.
- Raha, S. & Ahmaruzzaman, M. 2022. ZnO nanostructured materials and their potential applications: Progress, challenges and perspectives. *Nanoscale Advances* 4: 1868-1925.
- Ramani, M., Ponnusamy, S., Muthamizhchelvan, C. & Marsili, E. 2014. Amino acid-mediated synthesis of zinc oxide nanostructures and evaluation of their facet-dependent antimicrobial activity. *Colloids and Surfaces B: Interfaces* 117: 233-239.

- Serrano, J., Romero, A.H., Manjón, F.J., Lauck, R., Cardona, M. & Rubio, A. 2004. Pressure dependence of the lattice dynamics of ZnO: An *ab initio* approach. *Physical Review B* 69(9): 094306.
- Shekhawat, D., Vauth, M & Pezoldt, J. 2022. Size dependent properties of reactive materials. *Inorganics* 10(4): 56.
- Singh, G., Ubhi, M.K., Jeet, K., Singla, C. & Kaur, M. 2023. A review on impacting parameters for photocatalytic degradation of organic effluents by ferrites and their nanocomposites. *Processes* 11: 1727.
- Singh, J., Sharma, S., Soni, S., Sharma, S. & Ravi Chand Singh, R.C. 2019. Influence of different milling media on structural, morphological and optical properties of the ZnO nanoparticles synthesized by ball milling process. *Materials Science in Semiconductor Processing* 98: 29-38.
- Subash, N.S.P., Noraziah, M.Z., Nurul Amira, A.R., Nur Faizah, A.B. & Wong, K.K. 2023. Antimicrobial property of photocatalytic nanoparticles-coated personal protective equipment (PPE) on bacteria and fungi. *Sains Malaysiana* 52(10): 2931-2942.
- Verma, S.K., Panda, P.K., Jha, E., Suar, M. & Parashar, S.K.S. 2017. Altered physiochemical properties in industrially synthesized ZnO nanoparticles regulate oxidative stress; induce *in vivo* cytotoxicity in embryonic zebrafish by apoptosis. *Scientific Reports* 7: 13909.
- Zhou, X.Q., Hayat, Z., Zhang, D.D., Li, M.Y., Hu, S., Wu, Q., Cao, Y.F. & Yuan, Y. 2023. Zinc oxide nanoparticles: Synthesis, characterization, modification and applications in food and agriculture. *Processes* 11(4): 1193.

*Pengarang untuk surat-menyurat; email: arafidah@mardi.gov.my