

# POTENSI NANOKOMPOSIT SENGOKSIDA-PERAK (ZnO-Ag) METODE GELOMBANG MIKRO DALAM MENGHAMBAT PERTUMBUHAN BAKTERI *Escherichia coli* PENGHASIL *EXTENDED SPECTRUM BETA LACTAMASES* (ESBLs)

<sup>1</sup>Yulianto Ade Prasetya, <sup>1</sup>Khoirun Nisyak, <sup>1</sup>A'yunil Hisbiyah

<sup>1</sup>Program Studi Diploma III Teknologi Laboratorium Medis, STIKES Rumah Sakit Anwar Medika Sidoarjo  
Email: yuliantoadeprasetya@gmail.com

## Abstrak

*Escherichia coli* penghasil *Extended Spectrum Beta Lactamases* (ESBLs) merupakan bakteri yang mampu menghidrolisis antibiotik golongan beta laktam generasi kedua dan ketiga serta monobaktam. Bakteri ini menyebabkan insidensi tertinggi infeksi saluran kemih (ISK) yang utama di seluruh dunia. Seng oksida (ZnO) terbukti mampu melawan resistensi bakteri sedangkan perak (Ag) mampu melawan bakteri dengan menghambat sintesis dinding sel, protein, dan metabolisme sel. Nanokomposit merupakan penggabungan antara ZnO dan Ag yang berukuran nanometer (nm) dengan bantuan instrumen berupa *microwave* termodifikasi. Nanokomposit yang terbentuk dikarakterisasi dengan *X-Ray Diffractometer* (XRD) untuk mengetahui ukuran dan kristanilitas yang terbentuk. Uji aktivitas nanokomposit ZnO-Ag dilakukan dengan metode difusi sumuran menggunakan *cock borer* pada media Mueller-Hinton agar. Hasil yang didapatkan menunjukkan bahwa nanokomposit yang terbentuk berukuran 124,71 nm. Nanokomposit ZnO-Ag mampu menghambat bakteri *E. coli* penghasil ESBLs dengan diameter zona hambat yakni 11,35 mm. Nanokomposit ZnO-Ag berpotensi untuk dikembangkan sebagai alat medis berbasis nanokomposit ZnO-Ag dalam melawan bakteri penyebab infeksi nosokomial, salah satunya *E. coli* penghasil *Extended Spectrum Beta Lactamases* (ESBLs).

**Kata Kunci:** Nanoteknologi, Infeksi Saluran Kemih, *Escherichia coli*, Antibakteri, Seng Oksida- Perak

## 1. PENDAHULUAN

*Escherichia coli* merupakan bakteri patogen oportunistik yang berbentuk kokobasil dengan ukuran 2 x 0,8  $\mu\text{m}$ , fakultatif anaerob, tidak berspora, dan motil. Bakteri ini sering menyebabkan insidensi tertinggi infeksi saluran kemih dan saluran pencernaan pada manusia (Jacobsen *et al.*, 2018). Bakteri ini bertanggungjawab terhadap naiknya angka kesakitan, kematian, dan biaya kesehatan karena semakin banyaknya *E. coli* yang memiliki kemampuan menghasilkan enzim *Extended Spectrum Beta Lactamases* (ESBLs) (Prasetya, 2017). Enzim ESBLs mampu menghidrolisis antibiotik golongan beta laktam generasi kedua dan ketiga serta monobaktam. Penggunaan antibiotik yang tidak relevan merupakan faktor penyebab persebaran bakteri ini yang terus meningkat di berbagai belahan dunia (Soto *et al.*, 2014). Bakteri ini juga merupakan penyebab infeksi nosokomial tertinggi yang banyak ditemukan di peralatan medis seperti pemasangan kateter, peralatan operasi, dan aquades. Untuk itu diperlukan alternatif dalam mencegah persebaran infeksi nosokomial tersebut yakni dengan memanfaatkan nanoteknologi, dalam hal ini adalah nanokomposit.

Nanokomposit merupakan penggabungan dua atau lebih komposit yang berukuran nano (diameter kurang dari 300 nm) (Azam *et al.*, 2011). Nanokomposit yang digunakan dalam penelitian ini yakni menggabungkan Perak (Ag) dan Zink Oksida (ZnO) dengan minyak cengkeh sebagai reduktor (Ahmed *et al.*, 2016). Perak memiliki kemampuan dalam melawan resistensi bakteri dengan cara menghambat sintesis dinding sel bakteri, menghambat sintesis protein, dan metabolisme sel. Zink Oksida (ZnO) juga terbukti melawan resistensi bakteri dengan cara merusak integritas membran sel bakteri, mereduksi permukaan hidrofobik dan menghambat terjadinya transkripsi pada bakteri (Agarwal *et al.*, 2017). Penggabungan Ag dan ZnO memerlukan reduktor sebagai agen penstabil yakni minyak cengkeh (Azizi *et al.*, 2016). Minyak cengkeh merupakan komoditas ekspor terbesar di Indonesia dan jarang digunakan pemanfaatannya dalam bidang medis dan akan digunakan dalam penelitian ini. Pembuatan nanokomposit ZnO-Ag memerlukan instrumen yakni *microwave* yang termodifikasi. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas nanokomposit ZnO-Ag dalam melawan bakteri *Escherichia coli* penghasil *Extended Spectrum Beta Lactamases* (ESBLs).

## 2. METODE PENELITIAN

### 2.1. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Kimia Organik STIKES Rumah Sakit Anwar Medika untuk pembuatan Nanokomposit ZnO-Ag menggunakan microwave termodifikasi. Laboratorium Mikrobiologi dan Bioteknologi untuk kultur bakteri *Escherichia coli* penghasil *Extended Spectrum Beta Lactamases* (ESBLs) dan uji aktivitas nanokomposit ZnO-Ag terhadap *E. coli* penghasil ESBLs. Laboratorium Instrumentasi Jurusan Kimia Universitas Brawijaya untuk kandungan dan kadar minyak cengkeh menggunakan *Gas Chromatography Mass Spectrophotometry* (GCMS). Laboratorium Material Jurusan Teknik Material dan Metalurgi Institut Teknologi Sepuluh Nopember untuk pemeriksaan ukuran dan kristalinitas yang terbentuk pada Nanokomposit ZnO-Ag dengan alat *X-Ray Diffractometer* (XRD). Penelitian dilakukan selama enam bulan terhitung bulan Maret hingga September 2019.

### 2.2. Alat dan Bahan Penelitian

Peralatan yang dipergunakan dalam penelitian ini yakni Microwave termodifikasi, Gas Chromatography Mass Spectrophotometry (GCMS), X-Ray Diffractometer (XRD), Scanning Electron Microscope- Energy Dispersive X-Ray (SEM-EDX), Cawan Petri, Laminar Air Flow (LAF), Autoklaf, cock borerr, Oven, Timbangan analitik, dan Mikropipet. Bahan yang digunakan pada penelitian ini antara lain: Perak Nitrat ( $\text{AgNO}_3$ ), Zink Oksida (ZnO), Minyak Cengkeh, ammonia, etanol, Isolat *Escherichia coli* penghasil *Extended Spectrum Beta Lactamases* (ATCC 25922), Mueller Hinton agar, Nutrient Broth, dan Aquades.

### 2.3. Prosedur Kerja

#### 2.3.1. Minyak cengkeh yang digunakan

Minyak cengkeh yang digunakan dalam penelitian ini dibeli dari CV. Nusaroma Depok. Minyak cengkeh kemudian dikarakterisasi menggunakan *Gas Chromatography Mass Spectrophotometry* (GCMS) untuk mengetahui kadar dan kandungannya. Minyak cengkeh digunakan sebagai reduktor dalam pembuatan Nanokomposit ZnO-Ag dengan metode microwave termodifikasi.

#### 2.3.2. Kultivasi Bakteri *Escherichia coli* penghasil ESBLs

*Escherichia coli* penghasil *Extended Spectrum Beta Lactamases* (ATCC 25922) dibeli dari Balai Besar Laboratorium Kesehatan (BBLK) Surabaya. Kultivasi *E. coli* diremajakan dalam media *Nutrien Broth* yang mengandung *Ampicillin* 10  $\mu\text{g}$  dan diinkubasi selama 18 jam suhu 37<sup>0</sup>C dan digoyang-goyangkan dalam *rotary shaker*. Kultur uji kemudian digunakan dalam uji aktivitas Nanokomposit ZnO-Ag.

#### 2.3.3. Pembuatan Nanokomposit ZnO-Ag

Metode yang digunakan untuk sintesis nanokomposit ZnO-Ag/minyak cengkeh dengan gelombang mikro mengacu pada prosedur (Thema *et al.* (2016). Sebuah microwave dimodifikasi bagian atasnya dengan memberikan lubang untuk kondensor dan lubang untuk meneteskan bahan. Sebanyak 15 mL minyak cengkeh dilarutkan ke dalam 50 mL etanol dan ditambahkan 50 mL  $\text{Zn}(\text{Ac})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  1 mM, kemudian dimasukkan ke dalam microwave (400 W dan 2,45 GHz) pada temperatur 60<sup>0</sup>C selama 15 menit sambil diteteskan larutan NaOH 0,01 M sebanyak 25 mL. Suspensi yang terbentuk diperiksa absorbansi dengan spektrometer UV-Vis. Sebanyak 50 mL  $\text{AgNO}_3$  1 mM ditambahkan ke dalam suspensi tersebut sambil dilakukan pengadukan dan pemanasan pada microwave (60<sup>0</sup>C, 15 menit). Produk reaksi yang diperoleh disentrifugasi, endapan dicuci dengan etanol dan dikeringkan pada temperatur 100<sup>0</sup>C untuk menghilangkan sisa minyak cengkeh. Nanokomposit yang telah terbentuk kemudian dilakukan analisa menggunakan *X-Ray Diffractometer* (XRD) untuk mengetahui ukuran dan kristalinitas

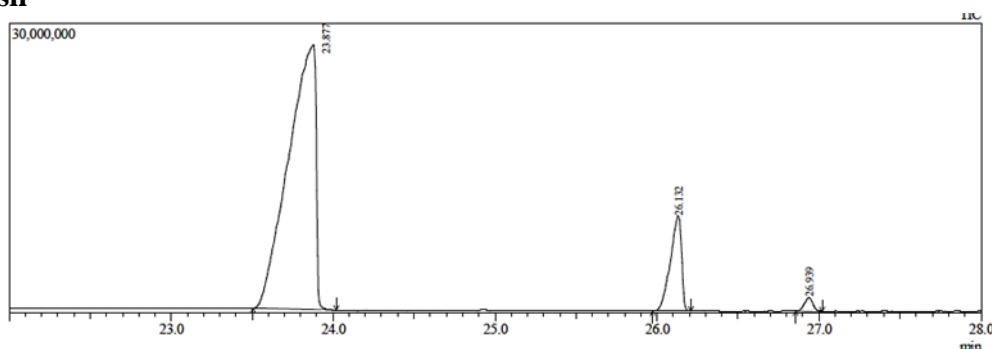
yang terbentuk dan *Scanning Electron Microscope- Energy Dispersive X-Ray* (SEM-EDX) untuk mengetahui morfologi nanokomposit yang terbentuk.

#### 2.3.4. Uji Aktivitas Nanokomposit ZnO-Ag terhadap *Escherichia coli* penghasil ESBLs

Nanokomposit ZnO-Ag yang telah terbentuk kemudian dilakukan uji aktivitas antibakterinya terhadap bakteri multiresisten yakni *Escherichia coli* penghasil *Extended Spectrum Beta Lactamases* (ESBLs). Satu ose koloni diinokulasikan dalam media Nutrien Broth-Ampisilin sebanyak 7 ml. Kultur kemudian diinkubasi selama 18 jam suhu 37°C pada *rotary shaker*. Biakan sebanyak 1000 mL diinokulasikan dalam cawan Petri steril kemudian ditambahkan media *Muller Hinton agar* sebanyak 20 mL dan digoyang-goyangkan membentuk angka delapan agar merata dan dibiarkan hingga padat. Biakan kemudian diberikan lubang menggunakan *cock borer* dan diisi dengan larutan nanokomposit ZnO-Ag yang telah dilarutkan dalam *Dimethylsulfoxide* (DMSO) sebanyak 100 µL. Biakan kemudian diinkubasi selama 24 jam suhu 37°C dalam inkubator. Kontrol negatif yang digunakan dalam penelitian ini adalah DMSO, sedangkan kontrol positif yang digunakan adalah Meropenem 10 µg. Zona penghambatan dihitung berdasarkan diameter zona bening yang terbentuk dengan kriteria <9 mm nonaktif; 9-12 mm aktif parsial; 13-18 mm aktif; dan > 18 mm sangat aktif. Perlakuan ini dilakukan sebanyak tiga kali ulangan (Prasetya *et al.*, 2019).

### 3. HASIL DAN PEMBAHASAN

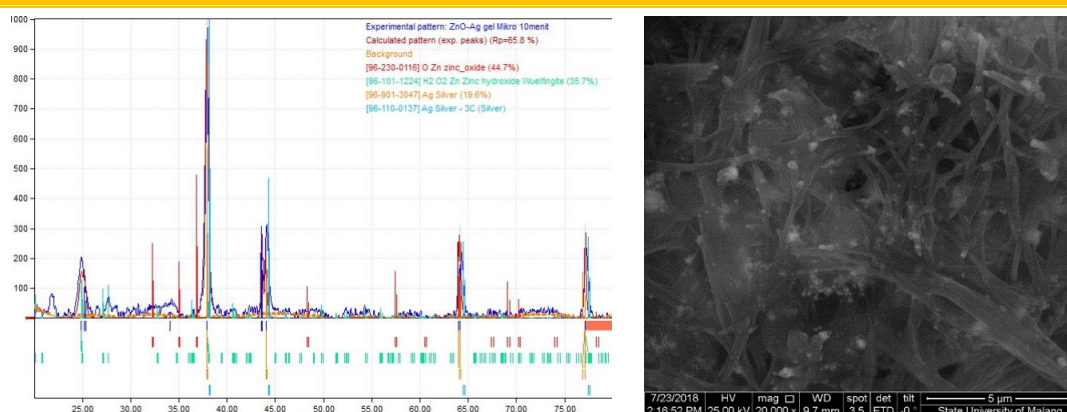
#### 3.1. Hasil



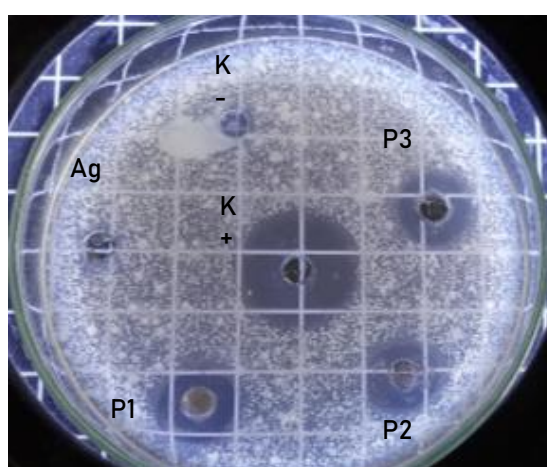
Gambar 3.1. Kromatograf minyak cengkeh dengan puncak tertinggi Eugenol



Gambar 3.2. Sintesis Nanokomposit ZnO-Ag dalam microwave termodifikasi (a) dan Hasil Nanokomposit yang terbentuk (b)



**Gambar 3.3** Hasil Karakterisasi X-Ray Diffraction (XRD) (kanan) dengan persentase 80,4 ZnO dan 19,6 Ag. Hasil Scanning Electron Microscope- Energy Dispersive X-Ray (SEM-EDX) (kiri), dimana ZnO berukuran fiber sedangkan Ag berbentuk droplet



**Gambar 3.4.** Hasil uji aktivitas Nanokomposit ZnO-Ag dengan diameter zona hambat retata 11, 35 mm (K= kontrol; P=Perlakuan, Ag= Perak)

### 3.2. Pembahasan

Nanokomposit merupakan penggabungan antara dua material atau lebih dalam skala nanometer (nm) (Hardiawan *et al.*, 2018). Penelitian ini menggunakan dua logam yakni Perak (Ag) dan Zink Oksida (ZnO), dimana untuk menggabungkan dua logam tersebut membutuhkan suatu reduktor dan agen penstabil. Nanokomposit memiliki luas permukaan yang sangat tinggi dan memiliki reaktivitas yang spesifik sehingga banyak dimanfaatkan pada penelitian akhir-akhir ini dalam bidang medis karena mampu meningkatkan sistem penghantaran obat dalam tubuh (Irvani *et al.*, 2014). Kriteria agen penstabil dan reduktor (dalam hal ini dinamakan bioreduktor karena menggunakan bahan alam) yakni harus memiliki setidaknya gugus hidroksil (-OH), gugus karboksil (-COOH) dan ikatan rangkap maupun gugus-gugus fungsi lain yang kaya akan elektron (Ahmed *et al.*, 2016; Agarwal *et al.*, 2017). Pada penelitian ini yang digunakan adalah minyak cengkeh, dimana minyak atsiri ini memiliki aroma khas dan merupakan komoditas tinggi di Indoensia. Belum banyak laporan tentang penggunaan minyak cengkeh dalam pemanfaatannya sebagai bioreduktor nanokomposit dalam dunia medis (Bobo *et al.*, 2016). Minyak ini memiliki senyawa fenilpropanoid yang memiliki cincin aromatik, gugus metoksi, gugus hidroksil, dan ikatan rangkap sehingga cocok digunakan untuk penelitian ini. Sintesis nanokomposit ini dapat dikatakan menggunakan prinsip *green synthesis*, dimana prinsip metode ini adalah efisiensi energi dan lama waktu terjadinya reaksi. Metode ini juga

menerapkan *one pot synthesis*, dimana reaksi antara Ag, ZnO, dan minyak cengkeh dilakukan dalam satu wadah secara langsung (Iravani *et al.*, 2016).

Minyak cengkeh yang digunakan dalam penelitian ini telah dikarakterisasi (Gambar 3.1), dimana kromatogram puncak didapatkan senyawa eugenol sebesar 48.1%. Penelitian lain juga menunjukkan bahwa mayoritas mengandung senyawa eugenol dan terdapat juga senyawa lain yakni eugenil astat, beta karyofilene, dan alpha humulen. Minyak cengkeh didapatkan dari tanaman cengkeh (*Syzygium aromaticum* L.) yang dapat diisolasi bagian pucuk bunga, daun, dan rantingnya. Minyak cengkeh yang digunakan sebagai agen penstabil dan bioreduktor untuk sintesis nanokomposit ZnO-Ag dilakukan dengan memanfaatkan gelombang mikro sebagai media pemanasannya (Fatimah, 2016). Pemanasan dalam hal ini dapat mengurangi berkurangnya durasi reaksi, meningkatkan kemurnian produk yang dihasilkan, mampu memodifikasi selektivitas material awalan, dan meningkatkan kinetika pembentukan produk (Mittal, 2015). Microwave dimodifikasi dibagian atasnya untuk memasukkan larutan sintesis. Metode sintesis dengan gelombang mikro yang memanfaatkan microwave sebagai sumber energi reaksi dan getarannya mampu memecah ukuran partikel menjadi berukuran kecil. Untuk memecahkan partikel ZnO menjadi berukuran kecil digunakan proses pemanasan dengan microwave selama 10 menit, selanjutnya ditambahkan larutan AgNO<sub>3</sub> secara tetes demi tetes untuk memperkecil ukuran produk reaksi yang dihasilkan dan direaksikan selama 10 menit. Produk reaksi yang dihasilkan disaring, endapan dikeringkan dan filtrat diukur panjang gelombangnya (Hisbiyah *et al.*, 2020) Endapan yang telah kering dianalisa kristalinitas, morfologi, dan ukuran partikelnya. Produk reaksi yang dihasilkan dikeringkan pada temperatur 110 °C selanjutnya dikarakterisasi. Endapan produk reaksi yang telah kering dilihat morfologinya dengan SEM-EDX. Pada spektrum EDX dapat dilihat unsur apa saja yang terkandung dalam produk reaksi. Produk ZnO dan ZnO-Ag yang dihasilkan yang dihasilkan pada daya 180 W ditunjukkan pada Gambar 3.2. Pada gambar 3.3 yang ditunjukkan dan spektrum EDX-nya menunjukkan bahwa ZnO yang terbentuk memiliki bentuk fiber, sedangkan partikel Ag berbentuk kubus. Berdasarkan spektrum EDX pada ZnO (a) terdapat unsur Zn (28,64%) dan O (71,36%), sedangkan pada ZnO-Ag (b) terdapat unsur Zn (8,19%), Ag (49,81%), dan O (42%). Hal tersebut menunjukkan pada daya 450 W partikel Ag terdeposit secara baik pada ZnO, akan tetapi bentuk morfologinya tidak beraturan (Nisyak *et al.*, 2020).

Pada uji aktivitas antibakteri *Escherichia coli* penghasil *Extended Spectrum Beta Lactamases* (ESBLs) didapatkan zona hambat sebesar 11,35 nm. ESBLs memiliki gen pengkode yang paling banyak ditemukan di plasmid terutama plasmid resistensi (plasmid R). Plasmid merupakan DNA ekstrakromosomal DNA yang dapat bereplikasi sendiri secara independen dan berbentuk sirkular dengan ukuran yang kecil, yakni 1–5% dari ukuran kromosom bakteri. Plasmid R sangat sering dijumpai dan terdistribusi secara luas di antara spesies dan genus bakteri. Umumnya plasmid mengode sifat yang secara fenotipik dikenali pada sel inangnya (Jamdagni *et al.*, 2016). Pada umumnya plasmid R adalah plasmid konjugatif dan mengandung gen yang dapat menyebabkan sel bakteri resisten terhadap sejumlah antibiotik, seperti sulfonamida, streptomisin, kloramfenikol, kanamisin, dan tetrasiklin. Plasmid R yang lain diduga juga mengandung gen resistensi terhadap logam berat, seperti merkuri, kobalt, cadmium, tembaga, arsenik, zink, perak, antimoni, tellurium, dan kromium, serta resistensi terhadap toksin seluler. Mayoritas faktor R mengandung dua kelompok gen, yaitu faktor transfer resistensi (*resistance transfer factor*, RTF) yang mencakup gen untuk replikasi plasmid dan konjugasi, dan determinan r (*r-determinant*) yang memiliki gen resistensi dan mengkode produksi enzim untuk inaktivasi obat-obat tertentu atau senyawa toksik.

#### 4. SIMPULAN, SARAN, DAN REKOMENDASI

Kesimpulan dari penelitian yang dilakukan bahwa Nanokomposit ZnO-Ag yang berukuran 124,71 nm mampu menghambat bakteri *Escherichia coli* Penghasil *Extended Spectrum Beta Lactamases* (ESBLs) dengan zona hambat 11,35 mm. Saran dan rekomendasi pada penelitian selanjutnya yakni perlu adanya variasi durasi gelombang mikro dan metode lain untuk menghasilkan nanokomposit yang memiliki ukuran lebih kecil dalam menghambat bakteri multiresisten.

#### 5. DAFTAR PUSTAKA

- Agarwal H., S.V.Kumar, and S.Rajeshkumar. (2017) A Review on Green Synthesis of Zinc Oxide Nanoparticles – An Eco Friendly Approach, *Resources–Efficient Technologies*, In Press.
- Ahmed, S., M.Ahmad, B.L.Swami, and S.Ikram(2016) A Review on Plants Extract Mediated Synthesis of Silver Nanoparticles for Antimicrobial Applications: A Green Expertise, *Journal of Advanced Research*, 7(2016): 17 – 28.
- Azam, A., A.S. Ahmed, M. Oves, M.S. Khan, S.S. Habib, and A. Memic (2011) Antimicrobial Activity of Metal Oxide Nanoparticles Against Gram Positive- Gram Negative Bacteria: A Comparative Study, *International Journal of Nanomedicine*, 7 (2011): 6003 – 6009.
- Azizi, S., R. Mohammad, R.A. Rahim, A.B. Moghaddam, M. Moniri, A. Ariff, W.Z. Saad, and F.Namvab (2016) ZnO-Ag Core Shell Nanocomposite Formed by Green Method Using Essential Oil of Wild Ginger and Their Bactericidal and Cytotoxic Effects, *Applied Surface Science*, 384 (2016):517-524.
- Bobo, D., K.J. Robinson, J. Islam, K.J. Thurecht, and S.R. Corrie (2016) Nanoparticles-Based Medicines: A Review of FDA Approved Materials and Clinical Trials to Date, *Pharmaceutical Research*, 33(10): 2373 – 2387.
- Fatimah, I. (2016) Green Synthesis of Silver Nanoparticles Using Extract of *Parkia speciosa* Hassk Pods Assisted by Microwave Irradiation, *Journal of Advanced Research*, 7 (2016): 961 – 969.
- Hadiyawardan, A., B.W. Rijal, M.A. Nuryadin, and Khairurrijal (2018) Fabrikasi Material Nanokomposit Superkuat, Ringan, dan Transparan Menggunakan Metode Simple Mixing, *Jurnal Nano Sains & Teknologi*, 1 (1): 14 – 21.
- Hisbiyah, A., K. Nisyak, Y.A Prasetya (2020) Synthesis of ZnO-Ag Nanocomposites through Ultrasonication-Microwave with Leaf Oil. *IOP Conference Series: Material Science and Engineering*. 833 (1): 012070
- Iravani, S., H. Korbekandi, S.V. Mirmohammadi, and B. Zolfaghari (2014) Synthesis of Silver Nanoparticles: Chemical, Physical, and Biological Methods, *Research in Pharmaceutical Sciences*, 9 (6): 385 – 406.
- Jacobsen, S.M., D.J. Stickler, H.L. Mobley, and M.E. Shirtliff (2018) Complicated Catheter-Associated Urinary Tract Infections Due to *Escherichia coli* and *Proteus mirabilis*, *Clinical Microbiology Review*, 21: 26-59.
- Jamdagni, P., P. Katri, and J.S. Rana, 2016, Nanoparticles based DNA Conjugates for Detection of Pathogenic Microorganism, *International Nano Letter*, 6 (2016): 139-146.
- Nisyak, K., Y.A Prasetya, A. Hisbiyah (2020) Synthesis of ZnO-Ag with Clove oil using Ultrasonication Method and Its Antibiofilm Activity Againsts *Klebsiella pneumoniae*. *IOP Conference Series: Material Science and Engineering*. 833 (1): 012081
- Prasetya, Y.A (2017) Identifikasi Gen CTX-M pada *Escherichia coli* Penghasil Extended Spectrum Beta Lactamases (ESBLs) di RSUD Dr.Soetomo Surabaya. *Jurnal Teknologi Laboratorium*. 6 (2): 56-60.
- Prasetya, YA.,K.Nisyak, ER Amanda (2019) Aktivitas antibakteri Nanoemulsi Minyak Lengkuas (*Alpinia galangal* L. Willd) dalam menghambat pertumbuhan *Helicobacter pylori*. *Biotropika: Journal of Tropical Biology*. 7 (3): 136-142.
- Soto, S.M, 2014, Importance of Biofilms in Urinary Tract Infections: New Therapeutic Approaches, *Advances in Biology*, 2014: 13.
- Thema, F.T., E. Manikandan, M. Maaza, and A.F. Gurib, 2016, Single Phase Bunsenite NiO Nanoparticles Green Synthesis by *Agathosma betulina* Natural Extract, *Journal of Alloys Compounds*, 657 (2016): 655 – 661.