

Eksplorasi Keanekaragaman Kupu-Kupu (Lepidoptera) dan Status Konservasinya di Taman Nasional Gunung Merbabu Jawa Tengah

Yulianto Ade Prasetya^{1✉}, Khoirun Nisyak¹, A'yunil Hisbiyah¹, Elvina Dhiaul Ifititah², Arie Srihardiyastuti²

¹Program Studi Diploma III Analisis Kesehatan, STIKES Rumah Sakit Anwar Medika Sidoarjo

²Program Studi Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Brawijaya Malang

Info Artikel

Sejarah Artikel:

Diterima 11 Januari 2019

Disetujui 23 Maret 2019

Dipublikasikan 1 April 2019

Keywords:

Escherichia coli, ESBLs,

Nanocomposite, *Reflux*, *ZnO-Ag*

Abstrak

Extended Spectrum Beta Lactamases (ESBLs) merupakan enzim yang mampu menonaktifkan antibiotik golongan beta laktam generasi ketiga dan keempat, serta monobaktam. *Escherichia coli* merupakan kelompok *Enterobacteriaceae* yang paling banyak ditemukan menghasilkan enzim ESBLs. Hal tersebut menyebabkan semakin meningkatnya biaya perawatan di rumah sakit, angka kesakitan, dan angka kematian di berbagai negara, termasuk di Indonesia. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas nanokomposit ZnO-Ag dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Escherichia coli* penghasil ESBLs. Nanokomposit ZnO-Ag dibuat dengan metode reflus secara *one pot synthesis* menggunakan minyak cengkeh sebagai reduktor melalui *green synthesis*. Nanokomposit ZnO-Ag yang terbentuk yakni 73,21 nm kemudian diujikan pada bakteri *E.coli* penghasil ESBLs dengan metode Kirby-Bauer. Konsentrasi nanokomposit 100 µg/ml merupakan konsentrasi yang efektif dalam menghambat pertumbuhan *E.coli* penghasil ESBLs.

Abstract

Extended Spectrum Beta Lactamases (ESBLs) are enzymes that are able to deactivate third and fourth generation beta lactam antibiotics, as well as monobactam. *Escherichia coli* is the most commonly found group of *Enterobacteriaceae* which produces ESBLs enzymes. This has led to increasing costs of hospital care, morbidity, and mortality in various countries including Indonesia. This study aimed to determine the ZnO-Ag nanocomposite activity in inhibiting the growth of ESBLs-producing *Escherichia coli* bacteria. ZnO-Ag nanocomposite was made by reflux method using *one pot synthesis* using clove oil as a reducing agent through *green synthesis*. The ZnO-Ag nanocomposite formed was 73, 21 nm, then tested on *E. coli* which produced ESBLs using the Kirby-Bauer method. The concentration of 100 µg / ml nanocomposite is an effective concentration in inhibiting the growth of *E. coli* producing ESBLs.

✉ Alamat korespondensi:

E-mail: yuliantoadeprasetya@gmail.com

PENDAHULUAN

Escherichia coli merupakan patogen oportunistik yang selain menduduki posisi tertinggi penyebab insiden infeksi saluran kemih, juga menduduki presentase tertinggi bakteri penghasil ESBLs (Prasetya 2018). *E. coli* penghasil ESBLs bertanggung jawab terhadap wabah infeksi nosokomial, peningkatan morbiditas dan mortalitas, serta peningkatan biaya kesehatan (Prasetya 2017). *Extended Spectrum Beta Lactamases* (ESBLs) adalah kumpulan enzim yang dihasilkan oleh bakteri Gram negatif pembentuk biofilm dan bertanggung jawab terhadap resistensi antibiotik golongan β -laktam. Berdasarkan studi *cross-sectional* menggunakan rekam medik pasien rawat inap di instalasi rawat inap penyakit dalam RSUD Dr. Soetomo Surabaya, bakteri yang terbanyak didapatkan pada isolat klinis adalah *E.coli* (49,3%) dengan prevalensi penghasil ESBLs paling besar yakni mencapai 75% (Prasetya 2018).

Timbulnya berbagai penyakit yang disebabkan *E.coli* penghasil ESBLs, mendorong untuk terus dilakukannya eksplorasi bahan aktif sebagai bahan antibakteri, salah satunya adalah material logam berbentuk nanopartikel (1-100 nm). Irvani *et al.* (2014) menyatakan bahwa material nanopartikel memiliki luas permukaan yang tinggi dan reaktivitasnya spesifik sehingga sesuai untuk bahan obat dalam berbagai dosis serta meningkatkan regulasi sistem penghantaran obat dalam tubuh. ZnO terbukti memiliki aktivitas antimikroba yang secara aktif melawan bakteri Gram positif, Gram negatif, jamur patogen, dan memiliki aktivitas melawan resistensi bakteri (Azam *et al.* 2011), sedangkan Ag⁺ memiliki kemampuan merusak dinding sel bakteri, mengganggu metabolisme sel, dan menghambat sintesis sel bakteri. Ag dalam bentuk nanopartikel memiliki luas permukaan yang tinggi dan daya aktivitas antibakteri yang lebih kuat (Fatimah 2016).

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas nanokomposit ZnO-Ag

dalam menghambat pertumbuhan *Escherichia coli* penghasil ESBLs. Nanokomposit dibuat dengan menggunakan eugenol dari minyak cengkeh melalui *green one pot synthesis*.

METODE

Pembuatan Nanokomposit ZnO-Ag

Nanokomposit ZnO-Ag dibuat dengan metode refluks secara *one pot synthesis* menggunakan minyak cengkeh sebagai reduktor melalui *green synthesis*. Sebanyak 15 mL minyak cengkeh dilarutkan ke dalam 50 mL etanol sambil dilakukan pengadukan pada suhu kamar. Selanjutnya ditambahkan 50 mL Zn (Ac)₂ · 2H₂O 1 mM sambil dilakukan pengadukan pada temperatur 90°C. Proses reaksi dilakukan selama tiga jam pada kondisi pH 12 hingga didapatkan suspensi berwarna putih. Sebanyak 50 mL AgNO₃ 1 mM ditambahkan ke dalam suspensi tersebut sambil dilakukan pengadukan selama 30 menit hingga terbentuk perubahan warna menjadi coklat kemerahan.

Produk reaksi yang diperoleh selanjutnya dilakukan sentrifugasi selama 20 menit dengan kecepatan 10.000 rpm pada suhu ruang, kemudian endapannya dicuci dengan etanol dan dikeringkan pada temperatur 100°C untuk menghilangkan sisa minyak cengkeh. Supernatan yang merupakan nanokomposit ZnO-Ag digunakan untuk uji antibakteri, sedangkan endapannya dianalisis morfologi dan kandungan logamnya menggunakan SEM-EDX.

Kultur Bakteri yang digunakan

Pada penelitian ini digunakan kultur bakteri *Escherichia coli* penghasil *Extended Spectrum Beta Lactamases* (ESBLs) yang merupakan koleksi Laboratorium Mikrobiologi dan Bioteknologi STIKES Rumah Sakit Anwar Medika. Bakteri dikultur dalam medium *Nutrien Broth* (NB) selama 18-24 jam menggunakan *rotary shaker* dalam suhu kamar.

Uji Nanokomposit ZnO-Ag terhadap *Escherichia coli* penghasil ESBLs

Nanokomposit ZnO-Ag diujikan pada bakteri *E.coli* penghasil ESBLs dengan metode Kirby-Bauer. Filtrat yang merupakan produk nanokomposit ZnO-Ag yang terbentuk dibuat seri pengenceran menggunakan Dimethyl Sulfoxide (DMSO). Bakteri yang telah ditumbuhkan dalam medium NB selanjutnya di-swab pada media agar Mueller Hinton, kemudian diberi cakram yang telah diberi nanokomposit ZnO-Ag dengan konsentrasi 10 µg/ml-100 µg/ml. Biakan kemudian diinkubasi selama 24 jam suhu 37°C. Zona hambat yang terbentuk kemudian dihitung.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Nanokomposit merupakan komposit yang disusun dari material dengan dimensi berskala nanometer (nm) dan berulang-ulang pada jarak antar-bentuk penyusun struktur yang berbeda. Ikatan antar partikel yang terjadi pada material nanokomposit menentukan peningkatan dan pembatasan sifat material (Hadiyawardman *et al.*, 2008). Nanokomposit memiliki luas permukaan yang tinggi dan reaktivitasnya yang spesifik sehingga sesuai digunakan sebagai bahan pengobatan dalam berbagai dosis serta meningkatkan regulasi sistem penghantaran obat dalam tubuh (Iravani *et al.*, 2014). Material nanokomposit digunakan untuk keperluan nanodiagnosis (Jamdagni *et al.*, 2016), *nanomedicine* (Bobo *et al.*, 2016), fotokatalis (Diallo *et al.*, 2016), sensor fotoiodida (Therma *et al.*, 2016), dan antimikroba (Ahmed *et al.*, 2016). Pembentukan nanokomposit pada penelitian ini dengan metode refluks secara *green synthesis*.

Metode refluks merupakan metode yang umum digunakan untuk sintesis suatu bahan dengan memanfaatkan panas yang terisolasi dari suatu sistem. Untuk memecahkan partikel ZnO menjadi berukuran kecil digunakan proses pengadukan secara kontinyu selama 1 jam, selanjutnya ditambahkan larutan AgNO₃ secara tetes demi tetes untuk memperkecil ukuran

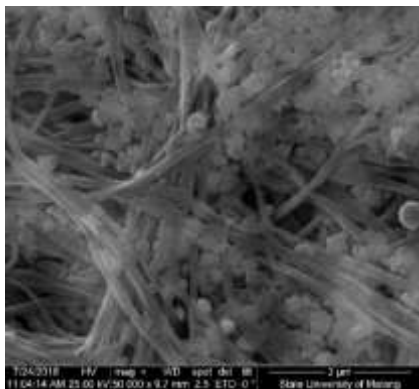
produk reaksi yang dihasilkan. Pada penelitian ini dilakukan pada temperatur 90°C. Selanjutnya produk reaksi yang dihasilkan disaring, endapan dikeringkan dan filtrat diukur panjang gelombangnya. Endapan yang telah kering dianalisa kristalinitas, morfologi, dan ukuran partikelnya. Metode pembentukan nanokomposit ZnO-Ag dilakukan juga secara *green synthesis* karena bersifat ramah lingkungan, proses yang cepat, dan ekonomis (Logeswari *et al.* 2013). Metode ini memanfaatkan agen reduktor dari senyawa aktif tanaman. Pada penelitian ini digunakan senyawa aktif minyak cengkeh yakni eugenol. Zat ini dipilih karena sebagai agen bioreduktor dan penstabil karena mengandung gugus hidroksil (-OH), gugus karboksil (-COOH), ikatan rangkap, maupun gugus fungsi lain yang kaya akan elektron (Ahmed *et al.*, 2016 dan Agarwal *et al.*, 2017). Pemanfaatan kandungan senyawa kimia dalam minyak atsiri sebagai reduktor dan agen penstabil dalam pembuatan nanomaterial belum banyak dilaporkan. Azizi *et al.* (2016) melaporkan senyawa zerumbone dalam minyak atsiri jahe dapat dimanfaatkan sebagai reduktor dan penstabil dalam pembuatan nanokomposit ZnO-Ag.

Nanokomposit ZnO-Ag yang dihasilkan pada penelitian ini berupa filtrat produk reaksi yang diukur panjang gelombangnya menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Berdasarkan hasil pengukuran panjang gelombang filtrat hasil produk sintesis dengan metode refluks sebesar 600 nm pada temperatur reaksi 90°C, mendekati panjang gelombang ZnO-Ag pada penelitian Azizi *et al.* (2016). Proses pembentukan ZnO dan filtrat produk reaksi yang dihasilkan ditunjukkan pada Gambar 1, terbentuk koloid berwarna putih menunjukkan terbentuknya ZnO. Produk reaksi yang dihasilkan dikeringkan pada temperatur 110°C selanjutnya dikarakterisasi. Endapan produk reaksi yang telah kering juga dilihat morfologinya dengan SEM-EDX. Pada spektrum EDX dapat dilihat unsur apa saja yang terkandung dalam produk reaksi. Gambar 2 menunjukkan produk ZnO-Ag yang dihasilkan

pada temperatur reaksi 90°C. ZnO yang terbentuk memiliki bentuk fiber, sedangkan partikel Ag berbentuk kubus. Berdasarkan spektrum EDX terdapat unsur Zn (10,6%), Ag (9,04%), dan O (80,35%). Presentase kecil Ag pada nanokomposit tersebut menunjukkan bahwa nanopartikel tersebut mampu menempel pada permukaan partikel ZnO (Azizi *et al.* 2016).



Gambar 1. Hasil nanokomposit ZnO-Ag dengan metode refluks



Gambar 2. Nanokomposit ZnO-Ag dengan SEM-EDX

Pada uji antibakteri *Escherichia coli* penghasil ESBLs (Gambar 3), zona hambat disajikan dalam Tabel 1. *E.coli* penghasil ESBLs memiliki gen pengkode ESBLs 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 (Prasetya 2017). Umumnya plasmid mengkode sifat yang secara

fenotipik dikenali pada sel inangnya. 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 (Prasetya 2018). Plasmid R yang lain diduga juga mengandung gen resistensi terhadap logam berat, seperti merkuri, kobalt, kadmium, 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 (Prasetya 2018).



Gambar 3. Uji Nanokomposit ZnO-Ag terhadap *Escherichia coli* penghasil ESBLs.

Tabel 1. Hasil Uji Nanokomposit ZnO-Ag terhadap *E. coli* ESBLs

Konsentrasi (µg/ml)	Zona Hambat (mm)
10	3,33
20	4,30
30	6,30
40	6,30
50	6,00
60	7,77
70	7,00
80	6,70
90	8,67

100 13,00

Berdasarkan data pada Tabel 1, nanokomposit ZnO-Ag konsentrasi 10 µg/ml sudah mampu menghambat *E.coli* ESBLs, namun zona hambat terbesar dihasilkan pada konsentrasi 100 µg/ml. Perlu kajian lebih lanjut mengenai formulasi ZnO dan Ag dalam membentuk nanokomposit sehingga didapatkan zona hambat yang lebih lebar, dan dapat dijadikan kandidat dalam terapi *E. coli* penghasil ESBLs penyebab infeksi nosokomial. Ukuran nanokomposit yang kecil berperan penting sebagai antibakteri *E.coli* penghasil ESBLs karena memiliki luas permukaan lebih besar yang kontak dengan bakteri tersebut. Seng Oksida (ZnO) merupakan material yang memiliki sifat semikonduktor, piezoelektrik, dan piroelektrik. ZnO dalam bentuk nanopartikel dimanfaatkan dalam bidang sensor, fotokatalis, dan ilmu biomedis karena bersifat ramah lingkungan (Agarwal *et al.* 2017). Logam perak memiliki kemampuan merusak dinding sel bakteri, mengganggu metabolisme sel, dan menghambat sintesis sel bakteri. Perak dalam bentuk nanopartikel memiliki luas permukaan yang tinggi sehingga lebih reaktif (Fatimah 2016). Nanokomposit ZnO-Ag merupakan gabungan dari nanopartikel ZnO dan nanopartikel Ag dengan ikatan elektrostatik, Ag terdeposisi pada permukaan ZnO membentuk ZnO-Ag (Azizi *et al.* 2016). Kemampuan nanokomposit ZnO-Ag diharapkan mampu menghambat pertumbuhan bakteri *E.coli* penghasil ESBLs yang perlu pernah dilaporkan sebelumnya. Nanokomposit ZnO-Ag pada bakteri Gram positif lebih efektif dibandingkan dengan Gram negatif, termasuk *E. coli* penghasil ESBLs. Pada bakteri Gram negatif terdapat lapisan Lipopolisakarida eksternal (LPS) yang terdapat dibagian luar yang melindungi lapisan peptidoglikan, tempat sisi aktif nanokomposit bekerja (Azizi *et al.* 2016). Pada penelitian ini didapatkan zona hambat yang lebih besar 13 mm pada *E.coli* penghasil ESBLs dibandingkan penelitian Azizi *et al.* (2016) sebesar 10 mm pada bakteri Gram

negatif *Salmonella choleraesuis*. Perlu penelitian lebih lanjut berkenaan dengan metode untuk menghasilkan nanokomposit yang memiliki diameter lebih kecil sehingga lebih efektif dalam menghambat bakteri *Escherichia coli* penghasil ESBLs.

SIMPULAN

Berdasarkan penelitian dapat diambil simpulan bahwa nanokomposit ZnO-Ag mampu menghambat pertumbuhan bakteri dengan konsentrasi paling efektif 100 µg/ml sebesar 13 mm, meskipun konsentrasi 10 µg/ml sudah mampu menghambat *Escherichia coli* penghasil *Extended Spectrum Beta Lactamases*. Perlu penelitian lebih lanjut berkenaan studi formulasi konsentrasi ZnO-Ag dan studi metode lain dalam membentuk nanokomposit.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini didanai oleh Kementerian Riset, Teknologi, dan Pendidikan Tinggi (Kemenristekdikti) yang bekerjasama dengan Institut Atsiri Universitas Brawijaya Malang.

DAFTAR PUSTAKA

- Ahmed S, Ahmad M, Swami BL, & Ikram S. 2016. A Review on Plants Extract Mediated Synthesis of Silver Nanoparticles for Antimicrobial Applications: A Green Expertise, *Journal of Advanced Research*, 7: 17-28
- Agarwal H, Kumar SV, & Rajeshkumar S. 2017. A Review on Green Synthesis of Zinc Oxide Nanoparticles-An Eco Friendly Approach. *Resources-Efficient Technologies*, 3(4): 406-413
- Azam A, Ahmed S, Overs S, Khan S, Habib B, & Memic A. 2011. Antimicrobial activity of metal oxide nanoparticle against gram positive-gram negative bacteria: a comparative study, *International Journal of Nanomedicine*, 7: 6003-6009
- Azizi S, Mohammad R, Rahim R, Moghaddam A, Moniri M, Arif A, Saad W, & Namwab F. 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: 517-524
- Bobo D, Robinson K, Islam J, Thurecht K, & Corrie S. 2016. Nanoparticles-Based Medicines: A Review of FDA Approved Materials and Clinical Trials to Date. *Pharmaceutical Research*. 33(10): 2373-2387
- Diallo A, Mothudi BM, Manikandan E, & Maaza M. 2016. Luminescent Eu₂O₃ Nanocrystals by *Aspalathus linearis* Extract: Structural and Optical Properties. *Journal Nanophotonics*, 10: 260-270.
- Fatimah I. 2016. Green synthesis of silver nanoparticle using extract: structural and optical properties. *Journal of Advanced Research* 7: 961-969
- Hadiyawardman A, Rijal BW, Nuryadin MA, & Khairurrijal. 2008. Fabrikasi Material Nanokomposit Superkuat, Ringan, dan Transparan Menggunakan Metode Simple Mixing. *Jurnal Nano Sains & Teknologi*. 1(1): 14-21
- Iravani S, Korbekandi S, Mirmohammadi N, & Zolfaghari B. 2014. Synthesis of silver nanoparticles: chemical, physical, and biological methods. *Research in Pharmaceutical Science*, 6(9): 385-406
- Jamdagni P, Katri P, & Rana JS. 2016. Nanoparticles based DNA Conjugates for Detection of Pathogenic Microorganism. *International Nano Letter*. 6: 139-146
- Logeswari P, Silambarasan S, & Abraham J. 2013. Ecofriendly Synthesis of Silver Nanoparticles from Commercially Available Plant Powders and Their Antibacterial Properties. *Scientia Iranica*. 20 (3): 1049-1054
- Prasetya YA. 2018. Deteksi gen SHV pada isolat klinik *Escherichia coli* penghasil Extended Spectrum Beta-Lactamases (ESBLs) dengan metode Polymerase Chain Reaction (PCR) dari urin pasien di RSUD Dr. Soetomo Surabaya. *AL-Kaunyah: Journal of Biology*, 2(11): 91-98.
- Prasetya YA. 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