

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Penyakit infeksi bakteri adalah salah satu penyakit dengan tingkat kematian yang cukup tinggi khususnya di negara berkembang (Pratiwi, 2017). Bakteri penyebab penyakit ini disebut bakteri patogen. Bakteri patogen dapat menyebabkan berbagai macam penyakit seperti TBC (Tuberkulosis), pneumonia, osteomyelitis, demam tifoid, kusta, karies gigi, plak gigi dan lain-lain (Khan, 2022; Chen et al., 2020). Bakteri menjadi salah satu penyebab tingginya angka kematian khususnya di negara berkembang (Khan, 2022). Peneliti telah mengembangkan terapi khusus untuk mengatasi masalah kesehatan yang disebabkan oleh bakteri patogen, seperti produksi antibiotik (Gupta et al., 2018). Namun, adanya penggunaan antibiotik yang tidak rasional menyebabkan banyak bakteri menjadi resisten terhadap antibiotik (Muhie, 2019). Bakteri resisten telah menjadi masalah kesehatan di seluruh dunia yang terus berkembang dan dianggap sebagai ancaman utama bagi kesehatan manusia dan lingkungan (Sun et al., 2022; Al-Khikani, 2020). Menurut data dari *Institute for Health Metrics and Evaluation* (IHME), dari 4,95 juta kasus kematian di seluruh dunia pada tahun 2019, terdapat 1,27 juta orang meninggal yang disebabkan oleh *Antimicrobial Resistance* (AMR) dan di Indonesia tercatat sebanyak 133.800 kasus (Gach et al., 2024).

Penelitian terbaru menunjukkan terdapat beberapa bakteri yang bersifat resisten terhadap antibiotik diantaranya *Mycobacterium tuberculosis*, *Burkholderia pseudomallei*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, dan *Escherichia Coli* (Giau et al., 2019). *World Health Organization* (WHO) menyatakan bahwa bakteri *Escherichia Coli* dan *Staphylococcus aureus* telah menunjukkan resistensi terhadap antibiotik yang umum digunakan dalam 50% kasus (Moradpoor et al., 2019). Sorg et al. (2016) menganalisis munculnya resistensi selama beberapa dekade terakhir menyebabkan obat-obatan yang ada saat ini semakin tidak efektif. Hal ini menunjukkan diperlukannya antibakteri baru yang dapat mengatasi permasalahan tersebut. Studi nanoteknologi merupakan strategi modern yang dikembangkan untuk mengatasi resistensi bakteri terhadap antibiotik (Phan et al., 2021). Nanoteknologi menarik perhatian yang semakin meningkat diseluruh dunia karena penerapannya yang semakin luas. Pemanfaatan nanoteknologi telah membawa harapan baru untuk melawan bakteri *multidrug resistant* (MDR) (Ma et al., 2022).

Sintesis nanopartikel logam termasuk salah satu penerapan nanoteknologi yang telah dikembangkan dalam produksi antibakteri (Satpathy dan Manikandan, 2019). Nanopartikel adalah partikel yang memiliki ukuran berkisar antara 1-100 nm. Ukuran nanopartikel yang sangat kecil memungkinkan nanopartikel dapat menembus ruang antar sel. Nanopartikel juga memiliki sifat reaktif karena luas permukaannya yang besar (Khan et al., 2017; Abdassah, 2017). Nanopartikel saat ini telah mengalami perkembangan yang pesat khususnya dalam bidang kesehatan sebagai penghantaran senyawa obat karena kemudahannya untuk dikonjugasikan dengan senyawa lain sehingga dapat menghasilkan senyawa baru dengan spesifikasi yang lebih baik (Martein et al., 2012). Nanopartikel Co merupakan salah satu nanopartikel logam yang banyak

diminati karena memiliki sifat katalitik, magnetik, elektronik dan aktivitas biomedis yang baik sehingga memiliki potensi dalam perkembangan nanoteknologi (Gupta et al., 2020).

Kelebihan nanopartikel Co dibandingkan dengan nanopartikel logam yang lain adalah sifat magnetik, dimana pada ukuran tertentu nanopartikel Co akan bersifat feromagnetik yang memungkinkan nanopartikel Co memiliki daya tarik yang kuat terhadap medan magnet dan dapat mempertahankan kemagnetannya tanpa adanya medan magnet. Meskipun nanopartikel besi juga memiliki sifat feromagnetik namun nanopartikel Co sifat feromagnetik yang lebih kuat karena adanya jumlah elektron tidak berpasangan lebih banyak yang dapat saling berinteraksi menyelaraskan momen magnet tanpa adanya medan magnet. Sifat magnetik nanopartikel logam juga sangat dipengaruhi oleh bentuk kristalnya, dimana nanopartikel Co memiliki bentuk kristal *Hexagonal Close-Packed* (HCP). Bentuk kristal tersebut menyebabkan nanopartikel kobalt memiliki sifat magnetik dan sifat mekanik yang lebih baik dibandingkan dengan nanopartikel logam lainnya (Nasralla et al., 2024). Aplikasi nanopartikel Co dalam sebagai antibiotik karena nanopartikel Co dapat memengaruhi produksi *reactive oxygen species* (ROS) yang berperan dalam menghambat berbagai jenis mikroorganisme seperti bakteri, jamur dan virus (Varaprasad et al., 2017). Ma et al. (2022), melaporkan bahwa Co memiliki aktivitas antibakteri yang lebih kuat dibandingkan dengan *ciprofloxacin*, obat antibiotik standar.

Sintesis nanopartikel logam yang telah dikembangkan umumnya masih menggunakan metode kimia dengan zat pereduksi seperti natrium borohidrat (NaBH_4), natrium sitrat ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$), dan alkohol yang memiliki sifat beracun sehingga dapat memberikan dampak negatif terhadap kesehatan dan lingkungan, serta metode fisika yang memerlukan tekanan, suhu dan energi yang tinggi, dan memerlukan waktu yang lama serta biaya yang lebih mahal (Ijaz et al., 2020; Esa dan Sapawe, 2020). Studi terbaru menunjukkan bahwa sintesis, karakterisasi, dan penerapan bahan nano semakin penting dalam beberapa dekade terakhir oleh karena itu diperlukan metode sintesis nanopartikel yang lebih ramah lingkungan (Defatha dan Surathkal, 2018). Metode *green synthesis* merupakan inovasi baru yang dikembangkan dalam sintesis nanopartikel. Metode ini memanfaatkan mikroorganisme, tumbuhan, alga atau produk sampingan lainnya seperti protein dan lipid sebagai agen bioreduktor (Mohammadi et al., 2021). Metode *green synthesis* memiliki kelebihan seperti sederhana, ramah lingkungan, tidak memerlukan banyak biaya, penggunaan energi yang lebih rendah serta produk yang dihasilkan lebih ramah lingkungan (Patra dan Baek, 2014).

Kitosan merupakan salah satu biopolimer yang dapat digunakan sebagai bioreduktor dalam sintesis nanopartikel. Kitosan adalah biopolimer hasil deasetilasi kitin yang diperoleh dari cangkang hewan laut seperti kerang-kerangan, udang, kepiting dan lain-lain. Kitosan memiliki sifat bioaktif, biokompatibel, pengkelat, biodegradasi, tidak beracun dan sifat antibakteri (Phan et al., 2021; Fuster et al., 2020). Kitosan memiliki gugus $-\text{NH}_2$ dan $-\text{OH}$ pada setiap monomernya yang dapat bereaksi dengan kation logam sehingga mampu bertindak sebagai bioreduktor (Prasetyaningtyas et al., 2020). Kerapatan muatan positif pada kitosan memungkinkan kitosan dapat berperan sebagai *capping agent* yang dapat mempertahankan bentuk nanopartikel logam agar tidak mengalami aglomerasi karena interaksi *Van Der Waals* antar permukaan logam (Wulandari et al., 2022). Kitosan tidak larut dalam air tetapi larut dalam larutan asam

encer seperti asam asetat dan asam sitrat pada $\text{pH} \leq 6,5$ (Ahmed dan Aljaeid, 2016). Menurut penelitian yang dilakukan oleh Gulati (2022), terdapat beberapa logam yang dapat direduksi dengan kitosan dengan aktifitas antibakteri yang baik, diantaranya logam Ag, Au, Co, dan ZnO.

Kemampuan polimer kitosan dalam mereduksi ion logam telah dibuktikan oleh Hashem et al., (2022) yang berhasil menyintesis nanopartikel Au dengan diameter rata-rata 20-120 nm dan aktivitas penghambatan yang baik terhadap bakteri *P. aeruginosa* dan *S. aureus* dengan zona hambat masing-masing 26 mm dan 21 mm. Sintesis nanopartikel Cu juga berhasil dilakukan oleh Manikandan dan Sathiyabama, (2015) yang menggunakan bioreduktor kitosan dengan ukuran rata-rata 20-30 nm dengan aktivitas penghambatan yang baik terhadap bakteri gram positif dan bakteri gram negatif. Aktivitas antibakteri dari nanopartikel disebabkan karena ukuran nanopartikel yang sangat kecil sehingga memungkinkan nanopartikel dapat dengan mudah menembus membran sel bakteri dan merusak sel bakteri melalui produksi *reactive oxygen species (ROS)* yang dapat menyebabkan stres oksidatif (Borisov et al., 2021). Adanya kitosan sebagai bioreduktor juga dapat menurunkan sifat toksik logam terhadap tubuh karena sifat kitosan yang biokompatibel dan non-toksik. Kitosan umumnya digunakan sebagai *capping agent* dalam menstabilkan suatu senyawa, sedangkan pemanfaatan kitosan sebagai bioreduktor masih sangat terbatas. Oleh karena sifat-sifat kitosan tersebut, pada penelitian akan dilakukan sintesis nanopartikel Co dengan menggunakan kitosan sebagai bioreduktor dan uji aktivitasnya sebagai antibakteri.

1.2 Rumusan Masalah

Rumusan masalah dari penelitian ini adalah:

1. bagaimana menyintesis nanopartikel Co menggunakan bioreduktor kitosan?
2. bagaimana karakteristik nanopartikel Co yang disintesis menggunakan bioreduktor kitosan?
3. bagaimana aktivitas antibakteri nanopartikel Co yang disintesis menggunakan bioreduktor kitosan terhadap bakteri *S. aureus* dan *S. mutans*?

1.3 Maksud dan Tujuan Penelitian

1.3.1 Maksud penelitian

Maksud penelitian ini adalah menyintesis dan mengarakterisasi nanopartikel Co menggunakan bioreduktor kitosan dan menguji aktivitasnya sebagai antibakteri terhadap bakteri *S. aureus* dan *S. mutans*.

1.3.2 Tujuan penelitian

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk:

1. menghasilkan nanopartikel Co dengan bioreduktor kitosan
2. menghasilkan data karakterisasi nanopartikel Co dengan bioreduktor kitosan
3. menghasilkan data uji aktivitas antibakteri dari nanopartikel Co dengan bioreduktor kitosan

1.4 Manfaat penelitian

Manfaat dari penelitian ini yaitu:

1. menghasilkan nanopartikel
2. memberikan data antibakteri dari nanopartikel Co dengan bioreduktor kitosan
3. membantu menyelesaikan masalah sehubungan dengan antibakteri khususnya pada gigi dan mulut
4. memberikan ilmu pengetahuan baru

BAB II

METODE PENELITIAN

2.1 Waktu dan Tempat

Penelitian ini dimulai pada bulan Februari–Juli 2024 di Laboratorium Kimia Organik, Departemen Kimia, Fakultas MIPA Universitas Hasanuddin; Laboratorium Kimia Terpadu, Departemen Kimia, Fakultas MIPA Universitas Hasanuddin; Laboratorium Penelitian dan Pengembangan Sains Fakultas MIPA Universitas Hasanuddin; Laboratorium Bioteknologi, Fakultas Peternakan; Laboratorium Forensik Polri Cabang Makassar dan Laboratorium Mikroskop Elektron, Pusat Penelitian Nanosains dan Nanoteknologi, Institut Teknologi Bandung.

2.2 Alat dan Bahan

2.2.1 Alat penelitian

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah alat-alat gelas yang umum digunakan di laboratorium kimia, botol semprot, *magnetic bar*, *magnetic stirrer*, neraca digital, *hot plate stirrer*, oven, jarum ose, *freeze-dryer*, *centrifuge* (TOMY MX-305), inkubator (ESCO CO2 Incubator), spektrofotometer UV-Vis (Shimadzu UV-1800), spektrofotometer Fourier Transform Infrared (Shimadzu IR Prestige-21), *Particle Size Analyzer* (Horiba SZ-100), dan Scanning Electron Microscope (Bruker).

2.2.2 Bahan penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu kitosan 1,5 kD dengan derajat deasetilasi 98%, $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (prekursor), asam asetat 1%, suspensi bakteri *Staphylococcus aureus*, suspensi bakteri *Streptococcus mutans*, larutan NaCl fisiologis 0,9%, *Muller Hinton Agar* (MHA), larutan kristal violet 0,1%, ampicillin 1%, akuabides, akuades, air steril, *tissue*, *aluminium foil*, dan plastik *wrapping*.

2.3 Metode Penelitian

2.3.1 Pembuatan larutan $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 2 mM

Padatan $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ sebanyak 0,1455 g dilarutkan dengan akuabides lalu dimasukkan ke dalam labu ukur 250 mL. Akuabides ditambahkan hingga tanda batas dan dihomogenkan untuk membuat larutan $\text{Co}(\text{NO}_3)_2$ 2 mM (Sharma & Sharma, 2021). Larutan $\text{Co}(\text{NO}_3)_2$ 2 mM dipipet sebanyak 37,5 mL; 25 mL; dan 12,5 mL lalu dimasukkan ke dalam labu ukur 50 mL. Akuabides ditambahkan hingga tanda batas dan dihomogenkan untuk membuat larutan $\text{Co}(\text{NO}_3)_2$ dengan konsentrasi 1,5 mM; 1 mM; dan 0,5 mM.

2.3.2 Pembuatan larutan kitosan

Padatan kitosan ditimbang sebanyak 2,5 g di dalam gelas kimia. Kitosan kemudian dilarutkan dengan asam asetat 1% sebanyak 250 mL lalu dipanaskan di atas *hot plate stirrer* pada suhu 50 °C selama 40 menit. Kitosan yang larut sempurna ditandai dengan larutan yang homogen dan jernih (Wahyuni et al., 2020).

2.3.3 Optimasi konsentrasi nanopartikel Co dengan kitosan

Optimasi konsentrasi bertujuan untuk mengetahui kondisi optimum dari konsentrasi logam yang akan digunakan dalam menyintesis nanopartikel melalui beberapa variasi konsentrasi larutan logam dan kitosan. Larutan $\text{Co}(\text{NO}_3)_2$ dengan konsentrasi 2 mM; 1,5 mM; 1 mM; dan 0,5 mM masing-masing dimasukkan ke dalam Erlenmeyer 100 mL sebanyak 25 mL yang berbeda, kemudian ditambahkan 25 mL kitosan 1% ke dalam setiap Erlenmeyer tersebut. Campuran diaduk dengan *magnetic stirrer* pada suhu ruang dengan kecepatan 500 rpm selama 8 jam. Campuran tersebut diambil pada jam ke-1, ke-3, dan ke-6 pada hari pertama pengadukan untuk diukur absorbansi dan panjang gelombangnya menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Pengukuran menggunakan spektrofotometer UV-Vis dilakukan satu kali setiap hari pada hari kedua dan seterusnya. Pengadukan dihentikan pada saat absorbansi telah mengalami penurunan intensitas yang signifikan (Sharma & Sharma, 2021; Taba et al., 2019).

2.3.4 Sintesis nanopartikel Co-kitosan

Nanopartikel Co disintesis dengan cara mencampurkan larutan logam $\text{Co}(\text{NO}_3)_2$ 1,5 mM dan larutan kitosan 1% ke dalam Erlenmeyer lalu diaduk dengan *magnetic stirrer* pada suhu ruang dengan kecepatan 500 rpm selama 6 jam. Campuran tersebut disentrifugasi pada suhu ruang dengan kecepatan 10.000 rpm selama 30 menit. Endapan hasil sentrifugasi dikeringkan menggunakan *freeze dryer* selama 15 jam pada suhu -45°C dan tekanan 1 mBar (Sharma & Sharma, 2021; Taba et al., 2019).

2.3.5 Karakterisasi nanopartikel Co

Nanopartikel Co dengan bioreduktor kitosan dikarakterisasi menggunakan spektrofotometer UV-Vis, FTIR (*Fourier Transformation Infrared*), PSA (*Particle Size Analyzer*), dan SEM (*Scanning Electron Microscopy*).

Karakterisasi dengan UV-Vis. Karakterisasi dengan spektrofotometer UV-Vis digunakan untuk menentukan karakteristik puncak serapan nanopartikel atau resonansi plasmon permukaan nanopartikel. Absorbansi dari sampel diukur pada panjang gelombang 200–800 nm. Sampel sebanyak 3 mL dimasukkan ke dalam kuvet lalu dianalisis menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Akuabides digunakan sebagai blanko (Wulandari et al., 2022).

Karakterisasi dengan FTIR. *Fourier Transform Infrared* (FTIR) digunakan untuk mengetahui gugus-gugus fungsi dalam nanopartikel. Endapan hasil sentrifugasi yang telah dikeringkan menggunakan *freeze dryer* diambil sebanyak 2 mg lalu dicampurkan

dengan 100 mg KBr. Campuran nanopartikel Co dan KBr dibuat menjadi pelet lalu dianalisis pada bilangan gelombang 4000 – 400 cm^{-1} (Amen, 2022).

Karakterisasi dengan PSA. *Particles Size Analyzer* (PSA) digunakan untuk mengukur distribusi ukuran nanopartikel (Ibrahim dan Ledyastuti, 2023). Sampel nanopartikel dimasukkan ke dalam kuvet. Kuvet yang telah diisi dengan sampel nanopartikel Co dimasukkan ke dalam *sample holder* lalu dianalisis menggunakan instrumen PSA (Nalawati et al., 2021).

Karakterisasi dengan SEM. Karakterisasi menggunakan *Scanning Electron Microscopy* (SEM) bertujuan untuk mengetahui morfologi permukaan nanopartikel. Sampel nanopartikel dipasang pada penyangga aluminium untuk menahan spesimen. Spesimen yang sudah dipasang kemudian diperiksa menggunakan SEM pada tegangan percepatan 20 kV (Tamimi dan Othman, 2023).

2.3.6 Uji antibakteri

Sterilisasi alat. Alat-alat yang akan digunakan dicuci bersih kemudian dikeringkan. Mulut tabung reaksi dan Erlenmeyer disumbat dengan kapas dan kain kasa steril. Alat yang terbuat dari gelas disterilkan dalam oven pada suhu 180°C selama 2 jam, sedangkan alat-alat yang tidak tahan terhadap suhu tinggi dan berskala disterilkan dalam autoclave pada suhu 121°C dengan tekanan 2 atm selama 15 menit. Jarum ose disterilkan dengan cara pemijaran di atas api bunsen hingga jarum ose mengalami pememijaran (Widyanti dan Fatmawati, 2022).

Pembuatan media Muller Hilton Agar (MHA). *Mueller Hinton Agar* (MHA) dimasukkan sebanyak 7,6 g ke dalam Erlenmeyer, kemudian ditambahkan akuades sebanyak 200 mL dan dipanaskan sambil diaduk hingga larut. Media MHA yang berada di dalam Erlenmeyer disterilkan dalam *autoclave* pada suhu 121°C dan tekanan 2 atm selama 15 menit (Rizki et al., 2023).

Persiapan suspensi bakteri uji. Bakteri uji *S. aureus* dan *S. mutans* diremajakan dengan cara ditumbuhkan pada media Mueller Hinton Agar (MHA) miring lalu diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Isolat bakteri kemudian disuspensikan menggunakan NaCl fisiologi 0,9% dan diukur kekeruhannya menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 580 nm hingga diperoleh nilai transmittansi 25% T (Fathoni et al., 2021).

Uji bioaktivitas antibakteri. Uji aktivitas antibakteri nanopartikel Co terhadap bakteri *S. aureus* dan *S. mutans* ditetapkan berdasarkan metode difusi agar menggunakan kertas cakram (*blank disc*). Sebanyak 0,2 mL suspensi bakteri uji diinokulasikan ke dalam media MHA yang masih cair (suhu $\pm 45^\circ\text{C}$) kemudian dihomogenkan hingga merata. Campuran media dengan bakteri uji selanjutnya dituang ke dalam cawan petri sebanyak ± 15 mL lalu dibiarkan hingga memadat. Sebanyak 5 *blank disc* dengan diameter 6 mm direndam ke dalam masing-masing 5 mL larutan nanopartikel Co 1%, logam $\text{Co}(\text{NO}_3)_2$ 1%, kitosan 1%, kontrol positif (ampisilin 1%) dan kontrol negatif (akuades) selama ± 15 menit. *Blank disc* yang telah direndam diinokulasi di atas permukaan media MHA yang telah memadat secara aseptis dan diberi jarak agar tidak *overlapping*. Media MHA yang berisi bakteri dan *blank disc* diinkubasi pada suhu 37°C selama 1 x 24 jam.

Diameter daerah hambat antibakteri diukur menggunakan jangka sorong setelah inkubasi selesai (Kosasi et al., 2019; Fatimah et al., 2022).