

SINTESIS NANOPARTIKEL KITOSAN-MAGNETIT TERSAMBUNG SILANG TRIPOLIFOSFAT SEBAGAI ANTIBAKTERI *Salmonella typhi* DAN *Staphylococcus aureus*

SYNTHESIS OF CHITOSAN-MAGNETITE NANOPARTICLES CROSS-LINKED TRIPOLYPHOSPHATE AS ANTIBACTERIAL *Salmonella typhi* AND *Staphylococcus aureus*

Agus Mahyati*, Soerja Koesnarpadi, Erwin

Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Mulawarman
Jalan Barong Tongkok No. 4 Kampus Gunung Kelua, Samarinda, 75123

*E-mail: agus.mahyati95@gmail.com

Received: 16 January 2020, Accepted: 20 October 2020

ABSTRACT

Magnetite is widely used in various fields of separation, biochemistry, medical and environment. Modification of nanoparticle magnetite binding with chitosan is recommended for many biomedical applications, especially as a drug delivery system because in addition to its non-toxic, biodegradable and biocompatible characteristics. Another advantage of biomedical benefits as antimicrobial is that it can increase antibacterial activity and has a more pronounced effect on gram-negative and gram-positive bacteria. Synthesis and characterization of chitosan-magnetite cross-linked tripolyphosphate as an antibacterial of *S. typhi* (Gram negative) and *S. aureus* (Gram positive) has been carried out. The phase of this research was initiated by the synthesis of $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ and $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ magnetite with a mass ratio of Fe (II): Fe (III) = 2: 3, using the co-precipitation method. In the second stage where the cross-linking of chitosan with TPP cross-linker to form ferrogel. In the third stage the synthesis of TPP-chitosan-magnetite in a ratio of 1: 4, with a slight addition of NH_4OH as participant material. The results showed that FT-IR on TPP-chitosan-magnetite has a unique spectrum, XRD results showed the crystal structure of TPP-chitosan-magnetite did not change. Surface morphology shows that TPP-chitosan-magnetite is a spherical surface. Chitosan-Magnetite material has greater antibacterial activity than chitosan and magnetite bacteria *S. typhi* (Gram negative) and *S. aureus* (Gram positive).

Keywords: Magnetite (Fe_3O_4), Chitosan-Tripolyphosphate-Magnetite, Tripolyphosphate (TPP) Cross-Linker, *Salmonella typhi*, *Staphylococcus aureus*.

PENDAHULUAN

Penyakit infeksi disebabkan oleh masuknya mikroorganisme ke dalam tubuh, kemudian berkembang biak dan menyebabkan penyakit. Salah satu mikroorganisme yang dapat mengakibatkan infeksi yaitu bakteri. Bakteri menyebabkan terjadinya penyakit infeksi maupun sistemik [1].

Salah satu penyakit menular adalah demam tifoid. Demam tifoid adalah penyakit infeksi yang disebabkan oleh bakteri *Salmonella typhi*. Jumlah kejadian penyakit ini termasuk tertinggi di dunia yaitu antara 358-810/100.000 penduduk setiap tahunnya. Penyakit demam tifoid ini bisa terjadi pada semua umur namun 77% terjadi pada kisaran usia 3-19 tahun. Selain itu *Salmonella typhi* dapat mengakibatkan gastroenteritis (keracunan makanan) serta septikemia. Penyakit demam tifoid telah diperburuk dengan terjadinya peningkatan resisten

bakteri terhadap banyak antibiotik [2]. Adapun penyakit infeksi lainnya yang disebabkan oleh bakteri *Staphylococcus aureus* adalah patogen utama pada manusia. Sebagian bakteri patogen yang menyebabkan bermacam-macam penyakit atau gangguan dalam tubuh seperti radang bernanah, sampai sepsis yang bias berakibat fatal. Sehingga bakteri ini dapat menyebabkan hemolysis yaitu pemecahan sel-sel darah menggumpalkan plasma karena sifat koagulasenya dan menghasilkan berbagai macam enzim-enzim yang dapat merusak sistem imun dan kandungan toksin pada bakteri tersebut yang bersifat destruktif [2].

Kitosan termasuk salah satu material yang sering digunakan sebagai antibakteri karena memiliki sifat intrinsik dan ekstrinsik. Semakin besar tingkat polimerisasi kitosan, maka akan semakin aktif sebagai antibakteri. Beberapa mekanisme

penghambatan mikroba oleh kitosan disebabkan oleh adanya interkasi muatan positif kitosan disamping itu, karena kitosan banyak mengandung gugus fungsional amina ($-NH_2$) yang bermuatan positif dapat menarik asam amino pembentuk protein pada mikroorganisme [3].

Suatu pendekatan yang efektif untuk pengembangan aplikasi kitosan dalam bidang medis adalah dengan memodifikasi permukaannya sehingga memberikan biofungsi dan sifat-sifat yang diinginkan. Salah satu material pemodifikasi untuk menstabilkan kitosan tersebut adalah magnetit nanopartikel. Nanopartikel banyak dimanfaatkan dalam bidang industri, lingkungan dan biomedis, Keunggulan manfaat biomedis lainnya sebagai antimikrobia yang dapat memperbesar aktivitas antibakteri [4] serta memiliki efek lebih jelas terhadap bakteri gram-negatif dan gram-positif. Pengikatan kitosan pada permukaan magnetit dapat meningkatkan kestabilan kedua material tersebut karena adanya peningkatan ikatan kovalen, perakitan mandiri dan penataan permukaan [5]. Berdasarkan pada uraian diatas maka penelitian ini bertujuan untuk menentukan karakteristik nanopartikel kitosan-magnetit dengan pengikat silang (cross-linker) tripolifosfat. Menentukan aktivitas antibakteri TPP-kitosan-magnetit terhadap bakteri *S. typhi* (Gram negatif) dan *S. auerus* (Gram positif).

METODOLOGI PENELITIAN

Alat

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu: Autoklaf, cawan petri, gelas ukur, Erlenmeyer, hot plate magnetik stirer termometer, stopwatch, labu ukur, pipet ukur, neraca analitik, buret, tiang statif, termometer vakum buchner dan serangkaian alat instrumen XRD, FTIR, dan SEM.

Bahan

Bahan-bahan yang digunakan meliputi kitosan bahan kemurnian p.a seperti $FeCl_3 \cdot 6H_2O$, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, NH_4OH , CH_3COOH , Natrium tripolifosfat (NaTPP), akuades, Nutrient Broth, Bakteri *S. typhi* (gram negatif) dan *S. auerus* (gram positif).

Prosedur Penelitian

Sintesis nanopartikel magnetit

Magnetit nanopartikel disintesis secara ko-presipitasi. Mencampurkan $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ dan $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ dengan cara melarutkan dalam larutan 100 mL dengan perbandingan massa $Fe(II):Fe(III) = 2:3$ dalam akuades 100 mL serta diaduk 30 menit sambil dipanaskan pada suhu $90^\circ C$ dengan

pengadukan magnetic stirer kemudian ditambahkan sedikit demi sedikit larutan NH_4OH 25% ke dalam campuran sampai pH 11. Endapan dibilas hingga netral dan didinginkan pada suhu kamar.

Pengikatan silang kitosan dengan cross-linker TPP

Pengikatan kitosan dengan cross-linker TPP dilakukan dengan cara melarutkan 0,5 gram kitosan dalam 50 mL asam asetat 1% Kemudian diaduk selama 30 menit hingga terbentuk ferrogel. Setelah 30 menit campuran tersebut ditambahkan 10 mL larutan crosslinker TPP: sitrat sambil diaduk dengan *magnetic stirrer*. Pengadukan ini dilanjutkan dengan tambahan waktu 30 menit. Kitosan-TPP yang diperoleh kemudian dicuci dengan akuades hingga netral dan disimpan dalam desikator kemudian dilakukan karakterisasi.

Sintesis nanopartikel TPP-kitosan-magnetit

Sebanyak 0,5 gram kitosan yang sudah terikat dengan 10 mL larutan cross-linker TPP, membentuk ferrogel kemudian dipanaskan pada suhu $65^\circ C$ sambil ditambahkan 2 gram magnetit dengan pengadukan magnetic stirrer kemudian ditambahkan sedikit demi sedikit larutan NH_4OH 25% ke dalam campuran sampai pH 6. Pengadukan ini dilanjutkan selama 1 jam. Endapan dibilas hingga netral dan didinginkan pada suhu kamar.

Sterilisasi alat

Alat-alat yang digunakan seperti tip 1000 μL dan tip 100 μL dimasukkan ke dalam wadah kaca dengan tutup yang rapat, kemudian disterilisasi dengan autoklaf pada suhu $121^\circ C$ selama 1 jam. Sedangkan cawan petri dicuci bersih dengan menggunakan air bersih. Kemudian dibungkus dengan kertas. Selanjutnya disterilisasi dengan autoklaf pada suhu $121^\circ C$ selama 1 jam.

Pembuatan media

Media yang digunakan adalah media padat nutrient agar (NA) serta media cair Luria Bertani. Media padat nutrient agar (NA) kedalam 100 mL akuades dan dihomogenkan dengan menggunakan stirrer yang kemudian disterilisasi dengan autoklaf pada suhu $121^\circ C$ selama 30 menit, selanjutnya media nutrient agar (NA) yang telah disterilisasi dituang ke dalam cawan petri steril secara aseptik di dalam laminar air flow dan didiamkan beberapa menit hingga media memadat. Sedangkan media cair Luria Bertani dibuat dengan melarutkan 5 gram yeast, 10 gram tripton dan 10 gram NaCl kedalam 1000 mL akuades dan dihomogenkan dengan menggunakan stirrer yang

kemudian disterilisasi dengan autoklaf pada suhu 121°C selama 30 menit.

Persiapan bakteri uji

Masing-masing bakteri uji *Salmonella typhi* dan *Staphylococcus aureus* dibiakkan dengan cara diinokulasikan kedalam 5 mL media cair Luria Bertani steril yang kemudian diinkubasi selama 16-18 jam pada suhu 37°C. Bakteri uji yang telah dibiakkan masing-masing diswab pada media padat nutrient agar (NA) menggunakan kapas swab steril secara aseptik hingga merata.

Skrining aktivitas antibakteri

Pada skrining aktivitas antibakteri digunakan metode difusi sumuran. Media padat nutrient agar (NA) dibuat lubang sumuran selanjutnya masing-masing material sebanyak 10 µL dimasukkan kedalam sumuran lalu diinkubasi selama 16-18 jam pada suhu 37°C. Untuk pengujian kontrol positif digunakan antibiotik ampisilin. Adanya zona bening disekitar kertas cakram menunjukkan adanya aktivitas antibakteri. Zona bening yang terbentuk pada masing-masing koloni diukur diameternya dengan menggunakan penggaris.

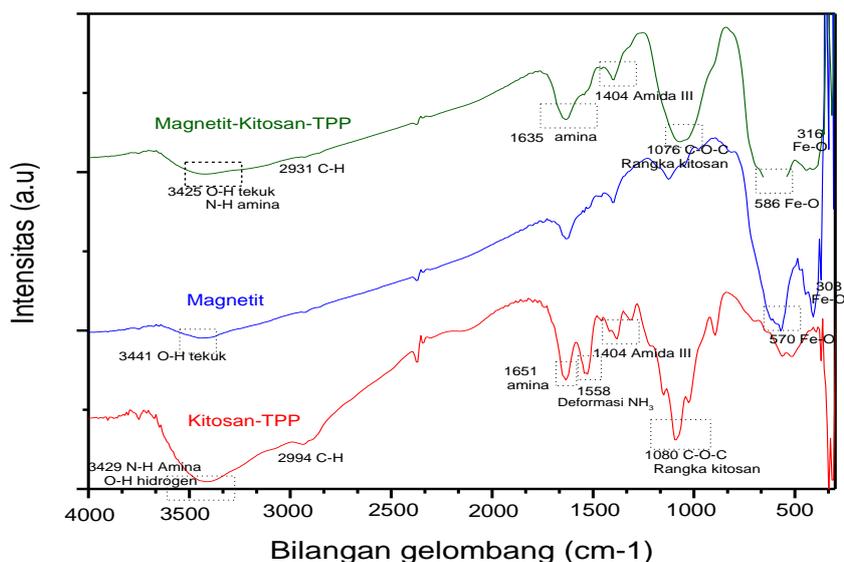
HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil Karakterisasi dengan Spektrofotometer FTIR

Analisis FTIR dilakukan untuk melihat gugus-gugus yang ada pada Kitosan-TPP, magnetit dan kitosan magnetit TPP dari Spektrum FT-IR untuk senyawa oksida besi terletak pada daerah frekuensi

rendah yaitu 1000-500 cm⁻¹. Spektrum FT-IR kitosan TPP, magnetit dan kitosan-magnetit TPP ditampilkan pada Gambar 1.

Hasil analisis gugus fungsi pada Gambar 1 menunjukkan bahwa terdapat perbedaan spektrum IR antara kitosan, magnetit dan kitosan-magnetit. Berdasarkan Gambar 1, spektra murni kitosan menunjukkan adanya serapan pada bilangan gelombang 3429 cm⁻¹ yang menandakan ada stretching ikatan hidrogen pada gugus O-H terjadi ikatan hidrogen dan N-H amina, tetapi pada spektra magnetit dan kitosan-magnetit memiliki bilangan gelombang yaitu 3441 cm⁻¹ dan 3425 cm⁻¹ mengalami pelebaran serapan dan pergeseran bilangan gelombangnya hal ini disebabkan memiliki magnetit. Vibrasi regang C-H alifatik dari kitosan menunjukkan serapan pada bilangan gelombang 2994 cm⁻¹. Pita serapan pada bilangan gelombang 1651 cm⁻¹ menunjukkan N-H amina. Spektra magnetit mengalami pergeseran bilangan gelombang menjadi 1527 cm⁻¹. Pita serapan pada 1404 cm⁻¹ menunjukkan adanya stretching C-N amida sedangkan pita serapan pada bilangan 1080 cm⁻¹ menunjukkan C-O-C yang merupakan kerangka pada kitosan. Pada spektrum FTIR untuk magnetit yang menyebabkan terbentuknya ikatan yang agak sedikit berbeda, yaitu hanya ikatan O-H dan N-H di panjang gelombang 3441 cm⁻¹. Pada panjang gelombang 570 cm⁻¹ puncak vibrasi site tetrahedral (v1) dan di panjang gelombang 308 cm⁻¹ site octahedral (v2) munculnya dua puncak daerah baru ini diakibatkan adanya logam Fe.



Gambar 1. Spektrum FTIR kitosan-magnetit, magnetit dan kitosan.

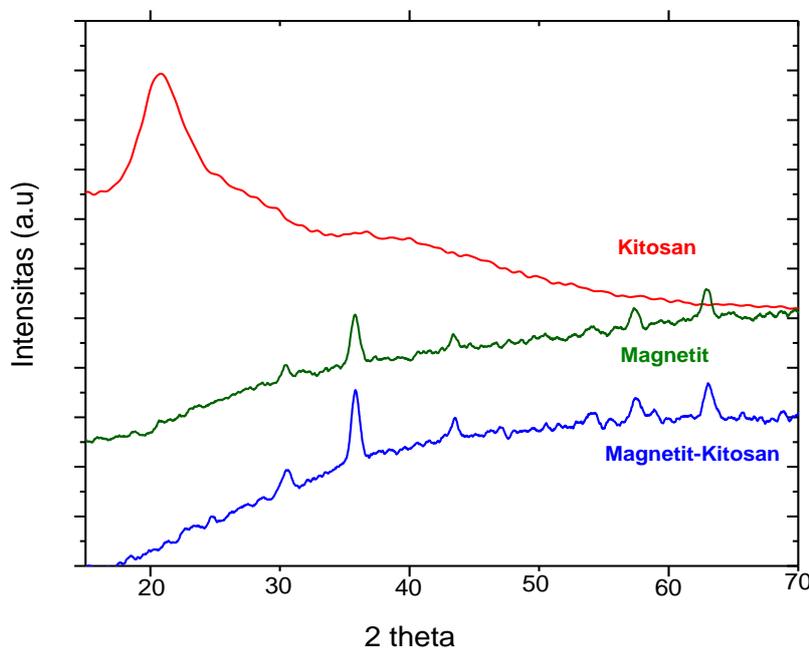
Pada gambar spektra IR kitosan-magnetit yang menyebabkan terbentuknya ikatan O-H dan N-H dipanjang bilangan 3425 cm^{-1} . Pita serapan pada bilangan gelombang 2931 cm^{-1} menunjukkan ikatan C-H. pada bilangan gelombang 1635 merupakan ikatan N-H amina dan pada bilangan gelombang 1404 cm^{-1} merupakan stretching dari gugus C-N amida. Cross-linker antara kitosan terlihat pada pita serapan bilangan gelombang 1076 cm^{-1} menunjukkan ikatan C-O-C yang merupakan kerangka pada kitosan dengan intensitas lemah yang menunjukkan adanya ikatan dengan magnetit. Interaksi kitosan dengan TPP dibuktikan dengan adanya pergeseran bilangan gelombang pada spektrum FTIR. Pada pita serapan Muncul dua puncak vibrasi baru yaitu site tetrahedral (ν_2) pada daerah serapan 586 cm^{-1} dan site oktahedral (ν_2) pada daerah serapan 316 cm^{-1} , hal ini menunjukkan telah terjadinya ikatan antara kitosan dengan magnetit.

Hasil Karakterisasi dengan Difraksi Sinar-X (X-Ray Diffraction)

Analisis XRD dilakukan untuk melihat struktur kristal yang ada pada magnetit dan K- Fe_3O_4 dari serapannya pada bilangan gelombang $2\theta = 10-70^\circ\text{C}$.

Spektrum XRD dari magnetit dan kitosan-magnetit ditampilkan pada Gambar 2.

Berdasarkan difraktogram diatas dapat diketahui pada sampel TPP-kitosan-magnetit terdapat puncak-puncak difraksi pada bidang hkl masing-masing sebesar (220), (311), (222), (400), (422), (333) yang sesuai dengan standar COD (Crystallography Open Database) nomor #96-900-2320 untuk Fe_3O_4 . Berdasarkan hasil dari overlay difatogram yang diperoleh, kemungkinan ada fasa lain dari oksida besi yang terdapat pada sampel yang dibuktikan dengan adanya puncak difraksi pada bidang hkl (311) dan (211). Terbentuknya fasa oksida besi yang lain, hal ini disebabkan karena sifat dari magnetit yang mudah teroksidasi. Pada puncak difraktogram kitosan-magnetit hasil sintesis mempunyai puncak-puncak difraksi Fe_3O_4 dan kitosan. Terdapat 6 puncak khas untuk sudut 2 theta $= (30,3^\circ), (35,5^\circ), (43,2^\circ), (57,1^\circ), \text{ dan } (62,7^\circ)$. sementara puncak pada 2 theta $= 20,0^\circ$ merupakan puncak khas dari kitosan. Berdasarkan kesesuaian pola difraksi tersebut telah terbentuk fase Fe_3O_4 dalam sempel magnetit dan kitosan-magnetit. Proses pelapisan menggunakan kitosan tidak menghasilkan perubahan fase Fe_3O_4 .

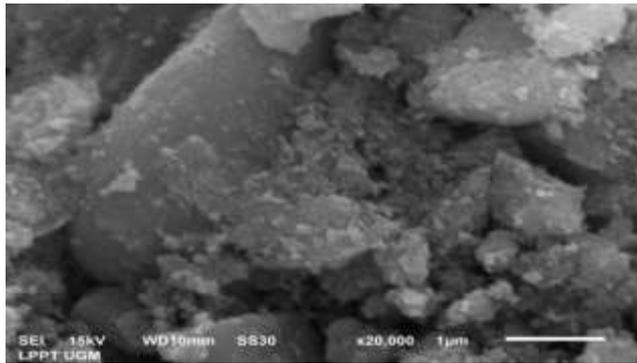


Gambar 2. Difraktogram kitosan, magnetit, kitosan-magnetit.

Hasil Karakterisasi dengan SEM

Pada Gambar 3, hasil analisis SEM kitosan-magnetit memiliki morfologi spheris berbentuk bulat yang tidak beraturan (asimetris) dengan ukuran partikel yang berbeda-beda. Adanya ukuran partikel

yang lebih besar disebabkan karena TPP tidak hanya membentuk cross-linker antar partikel dalam satu nanopartikel tetapi juga membentuk cross-link antara nanopartikel yang lain, sehingga nanopartikel saling bergabung membentuk ukuran yang lebih besar.



Gambar 3. Hasil analisis SEM kitosan-magnetit.

Uji Aktivitas Antibakteri

Pada uji aktivitas antibakteri dilakukan secara aseptik. Metode yang digunakan metode difusi agar. Dalam penelitian ini digunakan bakteri *S. typhi* dan *S. aureus* yang masing-masing mewakili bakteri Gram negatif dan Gram positif. Penggunaan kedua bakteri tersebut untuk mengetahui spektrum dari senyawa antibakteri yang terkandung dalam material magnetit dan kitosan magnetit, dimana suatu antibakteri dapat dikatakan spektrum luas apabila dapat menghambat pertumbuhan bakteri gram positif dan gram negatif dan dikatakan spektrum sempit apabila dapat menghambat salah satu dari bakteri tersebut, adapun kontrol positif dan kontrol negatif yang digunakan adalah ampisilin dan asam asetat.

Tabel 1. Hasil uji aktivitas antibakteri kitosan, magnetit dan kitosan magnetit.

Sampel	Diameter zona hambat (mm)	
	<i>S. typhi</i>	<i>S. aureus</i>
Asam asetat	8	8
Kitosan	10	10
Magnetit	10	10
Kitosan-magnetit	12	14
Ampisilin	18	20

Diameter zona bening untuk material kitosan dan magnetit pada bakteri *S. typhi* dan *S. aureus* berturut-turut yaitu masing-masing 10 mm yang dinyatakan bahwa aktivitas daya hambat pada bakteri *S. typhi* Gram positif tergolong kuat dan berspektrum luas karena dapat menghambat bakteri Gram positif dan Gram negatif. Beberapa mekanisme penghambatan mikroba oleh kitosan disebabkan oleh adanya interaksi muatan positif kitosan disamping itu, karena kitosan banyak mengandung gugus fungsional amina ($-NH_2$) yang bermuatan positif dapat menarik asam amino pembentuk protein pada

mikroorganisme [3]. Kemungkinan mekanisme yang lain adalah muatan positif kitosan berinteraksi dengan DNA bakteri, yang mengakibatkan terhambatnya sintesis RNA dan protein. Pada mekanisme ini kitosan harus mempunyai berat molekul kecil agar dapat masuk dalam sel mikroorganisme [3]. Dengan muatan negatif pada permukaan bakteri, yang menyebabkan perubahan permeabilitas permukaan sel. Hal ini akan menyebabkan hilangnya beberapa penyusun sel seperti protein, asam amino dan glukosa. Oleh karena itu kitosan akan menghambat metabolisme mikroorganisme dan akhirnya mengakibatkan kematian sel. Kitosan sebagai membran berpori juga dapat menyerap air pada makanan mikroorganisme sehingga pertumbuhannya terhambat.

Nanopartikel magnetit memiliki kemampuan menghambat pertumbuhan bakteri *S. typhi* dan *S. aureus* hal ini dapat dilihat dari lebar zona bening pada media yang telah ditanam bakteri. Nanopartikel magnetit yang berukuran lebih kecil lebih efektif dalam menghambat pertumbuhan bakteri. Pada dasarnya nanopartikel magnetit menempel pada dinding sel bakteri dan menembus membran selnya, hal ini dapat terjadi karena ukuran bakteri sekitar 0,7-0,2 μm untuk bakteri *S. aureus* sekitar 1,1 μm dengan diameter 0,7 μm untuk bakteri *S. typhi* [6] atau 700-1200 nm dan 1100 nm akibat masuknya partikel magnetit, dinding sel bakteri yang tebal dan kasar menjadi rusak sehingga mengakibatkan degradasi serta hilangnya sitoplasma dan karena itu menyebabkan kematian sel dimana ion-ion yang dilepaskan dari nanopartikel mengakibatkan stress oksidatif pada sel-sel akhirnya mengalami kerusakan DNA.

Mekanisme pada modifikasi kitosan-magnetit memiliki diameter zona hambat yang lebih besar dari pada kitosan ataupun magnetit. Aktivitas antibakteri kitosan-magnetit tergolong kuat dan memiliki zona bening yang luas dengan diameter zona hambat untuk bakteri *S. typhi* 12 mm dan untuk *S. aureus* 14 mm, dari hasil tersebut magnetit-kitosan tergolong kuat dengan spektrum luas. Hal ini menunjukkan bahwa bakteri Gram positif lebih mudah dihambat pertumbuhannya dari pada bakteri Gram negatif, ini disebabkan karena adanya perbedaan dinding sel antara bakteri Gram positif dan Gram negatif. Dinding sel bakteri Gram positif mempunyai satu lapis yang tebal sedangkan bakteri Gram negatif lebih kompleks dibandingkan dengan bakteri Gram positif. Perbedaan utamanya adalah adanya lapisan membrane luar yang meliputi peptidoglikan [7]. Kemampuan kitosan sebagai antibakteri diperkuat dengan pengikatan nanopartikel magnetit sehingga meningkatkan kestabilan kedua material tersebut

karena adanya peningkatan ikatan kovalen, perakitan mandiri dan penataan permukaan [5]. Mekanisme kitosan-magnetit dengan bakteri yaitu melalui teori kelat (*chelation theory*) dimana ketika ion logam di kelat dengan kitosan maka polaritas ion logam akan berkurang karena adanya tumpang tindih berbagai orbital kitosan yang menyumbangkan sebagian muatan positif ion logam dengan gugus donor sehingga lipofilitasnya meningkat dan kompleksnya dapat berpenetrasi atau masuk kedalam membran bakteri.

KESIMPULAN

Karakteristik nanopartikel kitosan-magnetit dengan pengikat silang (*cross-linker*) tripolifosfat membentuk kristal yang terikat pada kitosan dengan morfologi spheris berbentuk bulat yang tidak beraturan (*asimetris*). Material kitosan-magnetit memiliki aktivitas antibakteri yang lebih besar dari pada kitosan dan magnetit bakteri *Salmonella typhi* (*Gram negatif*) dan *Staphylococcus aureus* (*Gram positif*).

DAFTAR PUSTAKA

- [1] Rostinawati T. 2009. Aktivitas antibakteri ekstrak etanol bunga Rosella (*Hibiscus Sabdariffa L.*) terhadap *Escherichia coli*, *Salmonella typhi* dan *Staphylococcus aureus* dengan metode difusi agar. *Penelitian mandiri: Fakultas Farmasi Universitas Padjadjaran, Jatinangor.*
- [2] Esfahni A. S., Salehi M. T., Esfahni M .N., Ekramian E. 2015. Chitosan-modified superparamagnetic iron oxide nanoparticles: design, fabrication, characterization and antibacterial activity. *Islamic azad university*, 69(1): 19–32.
- [3] Zhang M, Li X. H, Gong Y. D, Zhao N. M., Zhang X. F. 2002. Properties and biocompatibility of chitosan films modified by blending with PEG. *Biomaterials*, 23:2641-2648.
- [4] Waluyo L. 2004. *Mikrobiologi Umum*. Malang: UMM Press.
- [5] Kaushik A., Khan R., Solanki P. R., Pandey P., Alam J., Ahmad S., Malhotra B. D. 2008. Iron oxide nanoparticles-chitosan composite based glucose. *Biosensor*, Elsevier, 24(4):676–683.
- [6] Jawetz E, Melnick J, Adelberg E. 1995. *Medical Microbiology*, 20th ed., Appleton & Lange, Connecticut.