

EVALUASI HEMATOTOKSIK SECARA IN VITRO NANOPARTIKEL ZnS HASIL REDUKSI BIOMATRIKS *Escherichia coli*

Lisa Kurniati, Andi Arjuna, dan Sukanto S. Mamada

Fakultas Farmasi, Universitas Hasanuddin, Makassar, Indonesia

Kata Kunci :

E. coli,
hematotoksitas, *in vitro*, nanopartikel ZnS

ABSTRAK

Nanopartikel ZnS merupakan material semi konduktor yang memiliki sifat unik dan manfaat yang besar dibidang kesehatan, terutama sebagai antibakteri dan biomarker kanker. Walaupun demikian, informasi mengenai toksisitas dari nanopartikel ZnS masih sangat terbatas. Oleh karena itu, pada penelitian ini telah dilakukan evaluasi hematotoksitas secara *in vitro* nanopartikel ZnS hasil reduksi biomatriks *Escherichia coli*. Penyiapan nanopartikel ZnS diawali dengan pencampuran dispersi ZnSO₄ konsentrasi 200 bpj ke dalam medium *Luria Bertani Broth* (LBB) yang ditumbuhkan *E.Coli* sebagai bioreduktor. Produk yang dihasilkan dikarakterisasi dengan uji *photoluminescence* (PL) dan spektrofotometri pada rentang panjang gelombang 250-700 nm. Hasilnya, nanopartikel ZnS berpendar biru dan diidentifikasi pada λ_{max} 288 nm dengan absorbansi 0,905. Partikel yang dihasilkan kemudian didispersikan dengan variasi volume 30 μ l, 40 μ l, 50 μ l pada larutan tyrod. Data persentase hemolisis secara berturut-turut adalah 32%, 39%, 22%, 0% (kontrol negatif) dan 100% (kontrol positif). Sehingga dapat disimpulkan bahwa nanopartikel ZnS hasil reduksi *E.coli* memberikan efek toksik terhadap sel darah merah.

PENDAHULUAN

Nanopartikel seng sulfida (ZnS) adalah bahan semikonduktor yang diketahui memiliki sifat yang unik sehingga banyak peneliti yang tertarik untuk melakukan penelitian terkait hal tersebut (1). Misalnya pada penelitian evaluasi kemampuan mendiagnosis biomarker kanker prostat miR-141 menggunakan CdSe/ZnS (2). Dalam beberapa penelitian, nanopartikel ZnS juga memiliki aktivitas yang sangat baik sebagai antibakteri dan sebagai biomarker kanker (3).

Secara umum, untuk sintesis nanomaterial ZnS dapat menggunakan metode fisika-kimia, tetapi pada metode tersebut membutuhkan suhu dan tekanan yang tinggi, reagen yang berbahaya, bahan baku yang mahal dan proses yang rumit (4).

Oleh karena itu, penggunaan mikroorganisme dan atau tanaman menjadi pilihan karena ramah lingkungan, contohnya menggunakan bakteri (4).

Berdasarkan penelitian oleh Wahyu Dirgantarah dkk, nanopartikel ZnS dapat diproduksi dengan menggunakan agen pereduksi bakteri *Escherichia coli*. Nanopartikel ZnS yang dihasilkan berupa dispersi koloidal dengan diameter partikel rata-rata 9,175 nm (5).

Walaupun nanopartikel ZnS yang dihasilkan dapat menjadi kandidat biomarker. Informasi tentang keamanan dan toksisitas masih sangat terbatas. Padahal pada beberapa studi, nanomaterial menunjukkan potensi sitotoksik, kerusakan DNA, dan stres oksidatif yang berpusat pada nanopartikel logam (6). ZnS pun dapat menyebabkan hemolisis pada sel darah merah (7).

Berdasarkan uraian di atas, maka peneliti tertarik untuk melakukan pengujian efekhematotoksitas dari nanopartikel ZnS hasil reduksi biomatriks bakteri *E. coli* dengan melihat efeknya terhadap sel

darah merah. Hasil penelitian ini diharapkan menjadi informasi ilmiah tentang keamanan dari nanopartikel ZnS hasil reduksi biomatriks *E. coli* terhadap sel darah merah manusia.

METODE PENELITIAN

Penyiapan Sampel

Penyiapan seed liquid

Dimasukkan komposisi media LBB (*peptone* 300 mg, *yeast extract* 130 mg, NaCl 300 mg) ke dalam erlenmeyer 100 ml yang berisi air suling 30 ml dan ditambahkan larutan glukosa 20% steril 0,3 ml. Dilakukan proses sterilisasi medium dengan menggunakan autoklaf, suhu 121°C, tekanan 1 atm selama 15 menit.

Penyiapan suspensi *Escherichia coli*

Biakan murni bakteri *E. coli* disuspensikan menggunakan air steril 5 ml secara aseptis sebelum melakukan proses inokulasi ke dalam *seed liquid*.

Tahap Produksi

Kultivasi seed liquid

Dimasukkan 1 ml suspensi bakteri *E. coli* ke dalam *seed liquid* kemudian dikultivasi selama 7 jam (fase pertumbuhan logaritma) pada *thermostat incubator* suhu 37°C yang *dishaker* 250 rpm.

Penyiapan larutan Zink Sulfat

Dilartukan 40 mg ZnSO₄ ke dalam 100 ml air steril yang kemudian ditambahkan ke dalam media LBB 100 ml untuk memperoleh konsentrasi larutan 200 bpj (konsentrasi tertinggi dibawah nilai KHM yang telah diperoleh sebelumnya) secara aseptis.

Masuk 28-12-2019
Revisi 01-02-2020
Diterima 15-02-2020

Korespondensi

Andi Arjuna
andiarjuna6854@gmail.com

Copyright

© 2020 Majalah Farmasi
Farmakologi Fakultas
Farmasi · Makassar

Diterbitkan tanggal
16-02-2020

DOI
10.20956/mff.v23i3.9398

Dapat Diakses Daring

Pada:
<http://journal.unhas.ac.id/index.php/mff>



Produksi Nanopartikel ZnS

Disiapkan 100 ml media LBB segar dalam erlemeyer 500 ml. Selanjutnya 1 ml *seed liquid* (kultivasi 7 jam) dimasukkan ke dalam media LBB segar tersebut untuk proses kultivasi selama 10jam (fase pertumbuhan stasioner) dengan perlakuan yang sama pada tahap pembuatan *seed liquid*. Kemudian hasil kultivasi tersebut ditambahkan larutan garam ZnSO₄ yang telah disiapkan. Disertakan medium LBB kontrol dengan tidak menambahkan ZnSO₄ ke dalamnya. Setelah penambahan ZnSO₄ tersebut, biakan diinkubasi kembali selama satu hari (1x24 jam) dan *dishaker* dengan kecepatan 250 rpm pada suhu 37°C dari prosedur tersebut akan diperoleh nanopartikel ZnS dengan bantuan biomatriks bakteri *E. coli*.

Evaluasi Nanopartikel Zink Sulfida

Pengamatan Pendaran

Setelah proses produksi, media LBB yang mengandung *E. coli* disentrifugasi pada kecepatan 6000 rpm selama 10 menit untuk memecah sel bakteri bersama protein medium dan mengendapkannya. Supernatan kemudian diambil untuk dilakukan pengamatan *photoluminescence* dibawah lampu UV.

Pengukuran Panjang Gelombang dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis

Supernatan yang telah diamati kemampuan fluoresensinya selanjutnya diukur menggunakan spektrofotometer UV-Vis untuk mengetahui panjang gelombang maksimumnya (λ_{maks}). *Scanning* dilakukan mulai dari panjang gelombang 250 nm hingga 700 nm.

Evaluasi Hematotoksisitas Nanopartikel ZnS

Sebanyak 2 ml darah yang diambil di Unit Tranfusi Darah (UTD) Kota Makassar dengan nomor seri F0830118a dicampur dengan PBS dengan volume 2 ml lalu disentrifugasi dengan kecepatan 6000 rpm selama 10 menit sehingga diperoleh larutan berupa pelet yang mengandung sel darah merah. Pelet selanjutnya dibersihkan dengan PBS disentrifugasi dengan kecepatan 6000 rpm selama 3 menit. Pembersihan ini dilakukan 3 kali sampai diperoleh sel darah merah murni. Sel darah merah murni kemudian didispersikan dengan PBS dengan perbandingan 1:10. Nanopartikel ZnS didispersikan dengan larutan tyrod dengan volume larutan 1:1 pada variasi konsentrasi larutan reduksi ZnS 30 μ l, 40 μ l dan 50 μ l. Untuk pengujian hematotoksisitas, larutan tyrod murni digunakan sebagai kontrol negatif. Variasi volume nanopartikel diambil dan ditambahkan ke dalam 200 μ l sel darah merah murni. Larutan kemudian diinkubasi pada suhu kamar selama 12 jam. Selanjutnya diperoleh supernatan kemudian diukur dengan menggunakan *microplate scanning spectrophotometer* dengan panjang gelombang 510 nm untuk melihat absorbansi. Semakin tinggi absorbansi yang didapatkan maka semakin besar tingkat toksisitas nanopartikel ZnS dalam sel darah merah. Kemudian dianalisis data dan dihitung persentase kematian sel dengan menggunakan rumus:

$$H\% = \frac{(OD \text{ Sampel} - OD \text{ kontrol negatif})}{(OD \text{ kontrol positif} - OD \text{ Kontrol negatif})} \times 100\%$$

Keterangan:

1. H% (Persentase kematian sel)
2. OD (*Optical Density*) sampel (ZnS)
3. OD (*Optical Density*) Kontrol negatif (tyrod)
4. OD (*Optical Density*) Kontrol positif (ZnSO₄)

Analisis Statistik

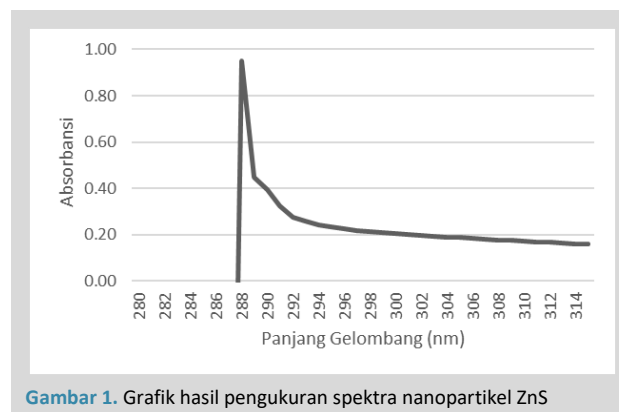
Data yang diperoleh dianalisis menggunakan software SPSS 20 dengan metode *Kolmonogorov-sminov* untuk melihat distribusi data normal kemudian dilanjutkan dengan metode analisis *one-way ANOVA* kemudian dilanjutkan dengan uji *post hoc* dengan menggunakan uji signifikansi *Boferroni*. *P-value* <0,05 dinyatakan signifikan secara statistik.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Sintesis nanopartikel ZnS pada penelitian ini menggunakan bahan pereduksi dari mikroorganisme yaitu dengan mereduksi ZnSO₄ menjadi ZnS dengan menggunakan bakteri. Hasil sintesis yang dihasilkan berupa dispersi koloidal yang kemudian diuji *photoluminescence* atau uji PL untuk melihat pendaran dari larutan tersebut sebagai salah satu bentuk konfirmasi terbentuknya nanopartikel. Pengamatan pendaran dilakukan dibawah penyinaran lampu UV 366 nm pada waktu inkubasi 1x24 jam (1 hari), 2x24 jam (2 hari), 3x24 jam (3 hari), dan 4x24 jam (4 hari).

Berdasarkan penelitian Dirgantarah dkk pendaran yang paling kuat terjadi pada hari keempat hasil yang didapatkan menghasilkan pendaran berwarna biru yang berdasarkan rujuka penelitian menandakan telah terbentuknya nanopartikel ZnS dengan estimasi ukuran nanopartikel \pm 2 nm (8).

Untuk memperkuat dugaan terbentuknya nanopartikel dilanjutkan dengan pengukuran panjang gelombang 250-700 nm menggunakan spektrofotometer dapat dilihat pada **Gambar 1**. Pada grafik tersebut puncak serapan diidentifikasi pada panjang gelombang 288 nm dengan absorbansi 0,945 a.u. Hal ini menunjukkan kesesuaian rekomendasi teori bahwa nanopartikel ZnS terbentuk pada panjang gelombang dengan kisaran 200-400 nm (5,9). Berdasarkan hasil dari spektra dan juga uji PL, nanopartikel ZnS diasumsikan telah terbentuk.



Gambar 1. Grafik hasil pengukuran spektra nanopartikel ZnS

Selanjutnya dilakukan pengujian hematotoksisitas untuk mengetahui toksisitas nanopartikel ZnS terhadap sel darah merah. Berdasarkan data yang diperoleh pada **Tabel 1**, yang dianalisis statistik dengan menggunakan aplikasi SPSS (*Statistical Package for the Social Sciences*) yang kemudian penentuan normalitas data dengan menggunakan uji *Saphiro-Wilk* data tersebut terdistribusi normal ($p>0,05$) dan uji *levene* juga mengonfirmasi bahwa varian data homogen ($p>0,05$).

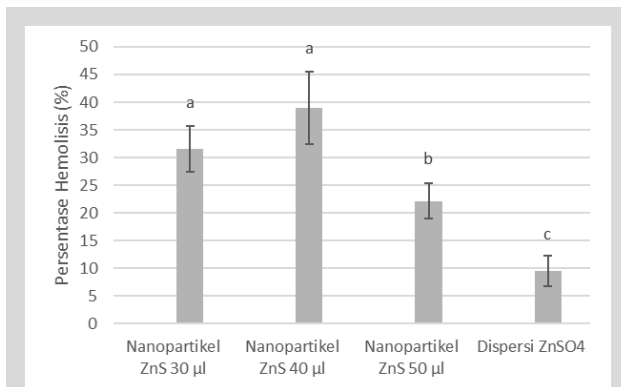
Selanjutnya, dilakukan analisis dengan menggunakan *One Way ANOVA* yang ($p<0,05$) dan Uji *post-hoc Bonferroni* untuk melihat kelompok yang memiliki perbedaan yang nyata. Data tersebut dapat secara ringkas dilihat pada lampiran

Berdasarkan grafik persentase hemolisis pada **Gambar 2** terlihat bahwa hasil pengujian toksisitas nanopartikel ZnS hasil reduksi *E.coli* terhadap sel darah merah yang berbeda-

Tabel 1. Hasil pengukuran toksisitas nanopartikel ZnS terhadap sel darah merah menggunakan *microplate rider*.

Perlakuan	Nanopartikel 30 µl (%)	Nanopartikel 40 µl (%)	Nanopartikel 50 µl (%)	Dispersi ZnSO ₄ (%)	K. Negatif (%)	K. Positif toksik (%)
1	33,137	48,555	22,337	12,075	0	100
2	31,469	42,395	16,854	11,976	0	100
3	37,670	32,981	22,823	5,948	0	100
4	27,213	37,254	23,063	10,290	0	100
5	28,147	33,770	25,443	7,233	0	100
Jumlah	157,636	194,955	110,519	47,522	0	500
Rata-rata	32	39	22	10	0	100
SD	4,194	6,509	3,170	2,790	0	0

beda dari variasi volume yang diberikan. Nanopartikel ZnS hasil reduksi *E. coli* dari volume 30 µl, 40 µl dan 50 µl, dispersi ZnSO₄ nanopartikel menunjukkan persentase hemolisis secara berurutan 32%, 39%, 22% dan 10% sedangkan pada kontrol negatif 0% dan kontrol positif 100%. Dari hasil statistik menunjukkan bahwa dispersi ZnSO₄ memiliki perbedaan nyata ($p < 0,05$) dengan variasi volume nanopartikel ZnS hasil reduksi *E. coli* dari volume V1 (30 µl), V2 (40 µl) dan V3 (50 µl). Perbedaan nyata dengan peningkatan % hemolisis dipengaruhi oleh ukuran dari nanopartikel yang lebih kecil dibandingkan dengan dispersi ZnSO₄.



Gambar 2. Grafik Persentase Uji Hematotoksitas

Keterangan:

1. % Hemolisis dihitung berdasarkan perbandingan relatif terhadap kontrol negatif (0% hemolisis) dan Kontrol positif (100% hemolisis).
2. Superscript yang berbeda menyatakan hubungan yang signifikan ($p < 0,05$).

Peningkatan % hemolisis dipengaruhi oleh ukuran dari nanopartikel tersebut karena semakin berkurang ukuran partikelnya maka perbandingan luas permukaan dengan volume akan semakin meningkat. Hal ini menghasilkan area permukaan yang semakin besar sehingga daya penetrasinya akan lebih cepat (Sharifi, Shahriar dkk, 2012).

Pada variasi volume V1 (30 µl) dan V2 (40 µl) tidak menunjukkan perbedaan yang nyata sedangkan antara variasi volume V1 (30 µl) dan V3 (50 µl), V2 (40 µl) dan V3 (50 µl) menunjukkan adanya perbedaan yang nyata. Dapat dilihat bahwa variasi volume yang kecil memiliki % hemolisis yang lebih besar dibandingkan variasi volume yang besar hal ini kemungkinan terjadi disebabkan karena pada variasi V3 (50 µl) memiliki konsentrasi yang lebih pekat yang diduga mengakibatkan perubahan secara fisika pada nanopartikel sehingga terjadi perubahan bentuk dan ukuran dari nanopartikel tersebut. Toksisitas yang terjadi dapat disebabkan oleh berbagai masalah seperti produksi ROS (*Reactive oxygen species*), pengurangan integritas membran,

pelepasan logam toksik yang dapat berikatan dengan dengan reseptor spesifik suatu sel, sehingga terjadi konformasi tertentu yang menyebabkan penghambatan fungsi sel normal yang berakibat pada sitotoksik, genotoksik dan kemungkinan terjadinya nekrosis pada sel. Ukuran nanopartikel yang kecil juga memiliki aktivitas yang sangat kuat sehingga semakin kecil partikelnya maka luas permukaannya juga akan lebih besar sehingga permeabilitasnya terhadap sel akan lebih mudah (6).

Hasil yang diperoleh merupakan rasio perbandingan relatif terhadap kontrol positif (100% hemolisis) dan kontrol negatif (0% hemolisis). Jika dibandingkan dengan variasi volume nanopartikel dan dispersi ZnSO₄ menunjukkan % hemolisis yang terjadi pada variasi volume dan dispersi ZnSO₄ tidak lebih besar dibandingkan dengan kontrol positif. Untuk kontrol negatif memiliki % hemolisis sebesar 0% dikarenakan pada kontrol negatif digunakan larutan tyrod yang memiliki fungsi mempertahankan sel dalam kisaran pH fisiologis, menjaga keseimbangan intraseluler dan ekstraseluler dan glukosa sebagai asupan energi untuk sel.

KESIMPULAN

Dari hasil penelitian dapat ditarik kesimpulan bahwa nanopartikel ZnS hasil reduksi bimatriks *E. coli* memberikan efek toksik terhadap sel darah merah.

DAFTAR PUSTAKA

1. Asha, P., Rajeswari, M. and Bindhu, B. 2016. Zinc sulfide nanoparticles : processing, properties and applications : an overview, *Journal of Chemical and Pharmaceutical Sciences*, 9(4), pp. 2047–2052.
2. Amily Fang-ju jou. dkk. 2015. Diagnosing the mir-141 prostate cancer biomarker using nucleic acid-functiolized cdSe/ZnS Qds and telomerase. *Chemical science*. 659-665
3. Sathishkumar, M. et al. 2017. characterization Antimicrobial activity of zinc sulphide nanoparticles and to study their characterization. *Research Gate*
4. Durán, N. and Seabra, A. B. 2012. Microbial Syntheses of Metallic Sulfide Nanoparticles : An Overview', *Current Biotechnology*, Volume 1 (Juni 2015), pp. 287–296. doi: 10.2174/2211550111201040287.
5. Dirgantarah, W. 2017. Studi Aplikasi Biomatriks Bakteri *Escherichia Coli* Pada Produksi *Quantum Dots* Zink' Skripsi tidak diterbitkan. Makassar. Fakultas Farmasi Unhas.
6. Jackson, T. C., Patani, B. O. and Israel, M. B. 2017. Nanomaterials and Cell Interactions : A Review', *Journal of Biomaterials and nanobiotechnology*, pp. 220–228. doi: 10.4236/jbnb.2017.84015.
7. Helle, M. et al. (2012) 'Visualisation of Sentinel Lymph Node with Indium-Based near Infrared Emitting Quantum Dots in a Murine Metastatic Breast Cancer Model', *PLoS ONE*, 7(8). doi: 10.1371/journal.pone.0044433.
8. Bogutskaya, K. I., Sklyarov, Y. P. and Prylutskyy, Y. I. 2013. Zinc and zinc nanoparticles : biological role and application in biomedicine. *Ucrainica Bioorganica* 9–16.
9. Rijas-Hernandez dkk. 2017. ZnS nanoparticles syhntesised through chemical aggregation using polyetieneimene that works as boyh stabilizser and complexing agent.

Sitasi artikel ini: Kurniati L, Arjuna A, Mamada SM. Evaluasi Hematotoksik Secara In Vitro Nanopartikel ZnS Hasil Reduksi Biomatriks *Escherichia coli*. *MFF* 2019; 23(3):82-84