



AKTIVITAS ANTIBAKTERI DAN ANTIBIOFILM NANOKOMPOSIT SENG OKSIDA-PERAK (ZnO-Ag) DENGAN MINYAK CENGKEH TERHADAP *Pseudomonas aeruginosa*

The Activities of Antibacteria and Antibiofilm Zinc Oxide-Silver (ZnO-Ag) Nanocomposite with Clove Oil against *Pseudomonas aeruginosa*

Yulianto Ade Prasetya^{1*}, Khoirun Nisyak², A'yunil Hisbiyah²

¹Laboratorium Mikrobiologi dan Bioteknologi, STIKES Rumah Sakit Anwar Medika Sidoarjo, Jalan Raya By Pass Krian Km. 33 Sidoarjo, Jawa Timur 61253

²Laboratorium Kimia Organik, STIKES Rumah Sakit Anwar Medika Sidoarjo, Jalan Raya By Pass Krian Km. 33 Sidoarjo, Jawa Timur 61253

*Email: yuliantoadeprasetya@gmail.com

ABSTRACT

Pseudomonas aeruginosa is a Gram-negative bacterium that often causes nosocomial infection because of its ability to produce biofilms so that it is resistant to various antibiotics. This research aims to determine the activity of zinc oxide-silver nanocomposites (ZnO-Ag) with clove oil against *P. aeruginosa* bacteria. ZnO-Ag nanocomposites were made using the Green One Pot Synthesis technique using a sonicator and microwave instruments. The nanocomposites formed were characterized by X-Ray Diffraction (XRD) to determine crystallinity and particle size and Scanning Electron Microscopy-Energy Dispersive X-Ray (SEM-EDX) to determine morphology and elements. The antibacterial activity and antibiofilm tests were carried out using the well diffusion and the microplate techniques, respectively. The resulted ZnO-Ag nanocomposite formed had a size of 19.66 nm, where Ag (47%) was of round shape, while Zn (35%) and O (18%) were fibrous. The ZnO-Ag had an inhibition zone of 14.9 mm against *P. aeruginosa* and was able to prevent the attachment of the bacterial biofilm for 48 hours with 76,59% inhibition percentage.

Keywords: antibacteria, antibiofilm, eugenol, *Pseudomonas aeruginosa*, nanotechnology

ABSTRAK

Pseudomonas aeruginosa merupakan bakteri Gram negatif yang sering menyebabkan infeksi noskomial karena kemampuannya menghasilkan biofilm sehingga resisten terhadap berbagai antibiotik. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas nanokomposit seng oksida-perak (ZnO-Ag) dengan minyak cengkeh terhadap *P. aeruginosa*. Nanokomposit ZnO-Ag dibuat dengan teknik *Green One Pot Synthesis* menggunakan instrumen sonikator dan gelombang mikro. Nanokomposit yang terbentuk dikarakterisasi menggunakan *X-Ray Diffraction (XRD)* untuk mengetahui kristalinitas dan ukuran partikel, *Scanning Electron Microscopy-Energy Dispersive X-Ray (SEM-EDX)* untuk mengetahui morfologi dan unsur yang terbentuk. Uji aktivitas antibakteri dilakukan dengan metode difusi sumuran dan uji antibiofilm dilakukan dengan teknik microplate. Hasil nanokomposit ZnO-Ag yang terbentuk memiliki ukuran sebesar 19,66 nm, dimana Ag (47%) berbentuk bulat sedangkan Zn (35%) dan O (18%) berbentuk fiber. Nanokomposit ZnO-Ag memunculkan zona hambat 14,9 mm terhadap *P. aeruginosa* dan mampu mencegah penempelan biofilm yang dihasilkan bakteri tersebut selama 48 jam dengan penghambatan 76,59%.

Kata Kunci: antibakteri, antibiofilm, eugenol, *Pseudomonas aeruginosa*, nanoteknologi

PENDAHULUAN

Pseudomonas aeruginosa termasuk bakteri Gram negatif, berbentuk batang, menghasilkan enzim oksidase dan katalase, mampu memproduksi pigmen serta termasuk β -hemolysis (Carroll et al. 2017). Bakteri ini tergolong patogen *opportunistic* yang sering menyebabkan infeksi pada pasien *immunocompromised* dan dikaitkan dengan penggunaan peralatan medis seperti kateter, stetoskop, dan defibulator (Long et al. 2018). Sebanyak 613 sampel strain *P. aeruginosa* yang berasal dari rumah sakit di India berhasil teridentifikasi dengan persentase tertinggi sebesar 28,35% ditemukan di Unit Gawat Darurat (UGD), dan diikuti dengan 26,86% *Intensive Mediatory Care Unit* (IMCU) 26,86%, dan *Neonatal Intensive Care Unite* (NICU) 16,41% dan sisanya 14,92% ditemukan di ruang pediatrik dan 13,43% di ruang jantung (Pal et al. 2010). Bakteri ini menjadi sangat susah untuk diobati karena kemampuannya menghasilkan enzim beta laktamase dan biofilm (Ding et al. 2016). Resistensi pada bakteri ini dibagi dalam tiga tipe, antara lain: *multidrug resistance* (MDR), *extensive drug resistance* (XDR), dan *pan-drug resistance* (PDR). Bakteri MDR memiliki sedikitnya resisten terhadap satu agen dalam tiga atau lebih kategori antimikroba. XDR didefinisikan sebagai bakteri resisten terhadap satu agen pada semua antimikroba kecuali dua atau lebih kategori, sedangkan bakteri dikatakan PDR jika resisten terhadap semua agen pada semua kategori antimikroba (Gill et al. 2016). Prevalensi *P. aeruginosa* di Iran pada kategori MDR dan XDR masing-masing sebesar 54,5% dan 33% (Saderi dan Owlia, 2015) sedangkan pada PDR sebesar 76% dari 38 isolat yang berasal dari rumah sakit pada pasien dengan luka terbuka (El-Shouny et al. 2018). Biofilm yang dihasilkan oleh bakteri ini juga bertanggungjawab terhadap prevalensi tersebut yang didefinisikan sebagai sekumpulan koloni bakteri yang menempel pada bahan netral seperti logam berat, permukaan mineral, bahkan pada jaringan tubuh manusia dengan mensekresikan *extracellular polymeric substance* (EPS) (Goncalves et al. 2014). Hampir 80% infeksi disebabkan oleh bakteri pembentuk biofilm yang mampu hidup pada kondisi lingkungan kekurangan nutrisi, perubahan pH ekstrim,

mampu menghindari fagositosis, dan mampu mentoleransi sejumlah antimikroba (Hall dan Mah 2017). Walaupun beberapa peralatan medis sudah dilapisi perak (Ag) namun infeksi nosokomial masih tinggi, sehingga diperlukan pengembangan bahan antibakteri dan antibiofilm dengan memanfaatkan nanoteknologi, salah satunya nanokomposit.

Nanokomposit didefinisikan sebagai penggabungan antara dua material atau lebih dengan ukuran kurang dari 100 nm yang memiliki beberapa keunggulan berupa luas permukaan yang tinggi, reaktivitas yang spesifik, dan mampu meningkatkan penghantaran obat (Ahmed et al. 2020). Nanokomposit dapat dibuat dari dua material yang memiliki sifat sebagai antibakteri yaitu perak (Ag) dan seng-oksida (ZnO). Logam perak efektif melawan lebih dari 650 spesies bakteri patogen, sehingga bersifat spektrum luas (Dastjerdi dan Montazer 2010). Logam ini bekerja dengan cara menghambat sintesis sel bakteri sehingga metabolismenya menjadi terhambat. Perak dalam bentuk nanopartikel mampu menghambat bakteri *P. aeruginosa* pada konsentrasi 5 ppm (Salomoni et al. 2017). Nanopartikel perak selain sebagai antibakteri juga dapat digunakan untuk obat antikanker, anti-inflamasi dan pengobatan luka (Ahmed et al. 2010). Seng oksida (ZnO) juga bersifat sebagai antibakteri dan antijamur dengan mekanisme kerja yaitu merusak dinding sel bakteri, menghambat sintesis sel, dan mengganggu metabolisme sel. Seng oksida banyak digunakan dalam dunia medis karena komponennya yang unik, biokompatibel, dan toksisitasnya rendah. Seng oksida dalam bentuk nanopartikel mampu menghambat pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* (Musdalifa et al. 2019). Walaupun demikian, belum ada penelitian yang menggunakan ZnO dan Ag sebagai antibiofilm pada *P. aeruginosa*. Nanokomposit ZnO-Ag dapat dibuat dengan menggunakan reduktor secara *green synthesis*. Metode *green synthesis* bersifat ramah lingkungan, ekonomis, sedikit menghasilkan produk buangan yang berbahaya dan menghasilkan hasil sintesis yang banyak. *Green synthesis* dibuat dengan memanfaatkan ekstrak tumbuhan sebagai bioreduktor yang banyak mengandung gugus hidroksil (OH), karboksil (-COOH), ikatan rangkap, dan kaya akan elektron (Hisbiyah et al. 2020). Salah satu bioreduktor yang

berpotensi digunakan untuk *green synthesis* nanokomposit ZnO-Ag adalah minyak cengkeh. Minyak cengkeh merupakan minyak atsiri khas Indonesia dan ditemukan berlimpah yang berasal dari tanaman *Syzygium aromaticum*. Minyak tersebut menjadi komoditas non-migas unggulan Indonesia, dengan genetika cengkeh yang besar dan sangat berharga untuk dikembangkan. Indonesia merupakan pemasok utama minyak cengkeh untuk pasar India dan Arab Saudi (Bustaman 2011). Kandungan minyak cengkeh yang utama merupakan eugenol (60-68%) dan memiliki aktivitas antioksidan (Perez-Roses et al. 2016). Eugenol merupakan senyawa golongan fenilpropanoid yang memiliki cincin aromatik, gugus metoksi (-COOH), gugus hidroksil (-OH), dan kaya akan ikatan rangkap (Hisbiyah et al. 2020) sehingga dapat digunakan sebagai bioreduktor pembentukan nanokomposit ZnO-Ag.

Penelitian ini menggunakan metode *One Pot Green Synthesis* untuk membuat nanokomposit seng oksida-perak (ZnO-Ag). Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui aktivitas nanokomposit seng oksida-perak (ZnO-Ag) dalam menghambat pertumbuhan bakteri dan biofilm yang dihasilkan *P. aeruginosa*. Penelitian tentang aplikasi nanokomposit ZnO-Ag dengan minyak cengkeh untuk menghambat penempelan biofilm pada bakteri *P. aeruginosa* belum pernah dilakukan sebelumnya, sehingga diharapkan dapat digunakan sebagai kandidat bahan untuk peralatan medis dalam mencegah penyebaran infeksi nosokomial.

BAHAN DAN METODE

Tempat dan waktu penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Kimia Organik STIKES Rumah Sakit Anwar Medika untuk distilasi fraksinasi eugenol dari minyak cengkeh berdasarkan perbedaan titik didih. Selain itu juga dilakukan pembuatan nanokomposit seng oksida-perak (ZnO-Ag) dengan minyak cengkeh menggunakan instrumen gelombang mikro (*microwave* termodifikasi) dan sonikator. Uji aktivitas antibakteri dan antibiofilm nanokomposit seng oksida-perak dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi dan Bioteknologi STIKES Rumah Sakit Anwar Medika. Analisa kandungan eugenol pada minyak cengkeh dilakukan di

Laboratorium Kimia Organik Universitas Brawijaya Malang. Analisa nanokomposit ZnO-Ag dilakukan di Laboratorium Kimia Material Departemen Teknik Material Institut Teknologi Sepuluh Nopember (ITS) Surabaya, sedangkan analisa menggunakan *Scanning Electron Microscope – Energy Dispersive X-Ray Spectroscopy* (SEM-EDX) dilakukan di Laboratorium Energi dan Lingkungan ITS Surabaya. Waktu penelitian dilakukan selama enam (6) bulan dari bulan Juni hingga Nopember 2019.

Alat dan bahan

Bahan-bahan yang digunakan pada penelitian ini antara lain: perak nitrat (Merck), zink asetat dihidrat (Merck), minyak cengkeh (Dampit-Malang), akuades (Brataco Chemical), amonia (Merck), *P. aeruginosa* ATCC 27853 isolat dari *Tropical Disease Diagnostic Center* (TDDC) Universitas Airlangga, *tryptic soy broth* (Merck), ethanol (Merck), agar Mueller-Hinton (MHA, Merck), dimethylsulfoxide (DMSO, Merck) dan kristal violet (Merck). Peralatan utama yang diperlukan untuk penelitian adalah Ultrasonikator (40 kHz 120 W), *microwave reactor* (Electrolux), oven (DGG 9053 A), timbangan analitik (Ohaus px224/E), *X-Ray Diffractometer* (Panalytical X'Pert Pro), *Scanning Electron Microscope-Energy Dispersive X-Ray Spectroscopy* (SEM-EDX, Hitachi FLEXSEM 1000), *microplate reader* (Bio-Rad), dan *Gas Chromatography-Mass Spectrophotometer* (GCMS, Shimadzu QP 2010).

Karakterisasi dan analisa minyak cengkeh

Minyak cengkeh berasal dari tempat penyulingan di Jalan Hayam Wuruk 85, Dampit Malang (S 8° 10' 17.134", E 112° 38' 20.958"), dan dianalisa kandungan eugenolnya menggunakan *Gas Chromatography-Mass Spectropotometry* (GC-MS). Kadar eugenol ditingkatkan dengan melakukan destilasi fraksinasi dengan tekanan 40 mmHg (Malahayati dan Rahmawati 2014). Pompa vakum pada tabung *trap* ditambahkan es dan garam dan dihubungkan dengan alat destilasi. Minyak cengkeh sebanyak 2 L dimasukkan ke dalam Labu ukur 5 L dalam *heating mantle*. Pemanasan dilakukan selama 3 jam dengan tekanan 10 mmHg. Uap minyak yang keluar pada kolom destilasi ditampung pada kondensor menjadi cairan. Pemurnian dilakukan dengan refluks pada

rasio 40/4 yang berarti setiap 40 detik pertama katup magnetis mengatur pengeluaran kondensat tertutup dan kondensat dikembalikan ke kolom fraksinasi, pada saat tersebut akan terjadi proses pemisahan dan 4 detik berikutnya katup akan terbuka. Hasil fraksinasi kemudian dianalisa dengan GC-MS.

GC-MS terdiri dari fase diam dan fase gerak. Fase diam yang digunakan adalah Rxi-1MS (100% dimetilpolisiloksan) dengan kolom yang memiliki panjang 30 cm dan diameter 0,25 mm. Fase gerak berupa gas helium yang dikondisikan pada tekanan 37,1 kPa dan memiliki volume injeksi sebesar 5 μ L, suhu injektor 250 °C, suhu sumber ion 230 °C, suhu permukaan 230 °C, dengan mode split 10. Kolom diatur pada suhu 70 °C dan akan naik mencapai suhu 230 °C dengan laju kenaikan 10 °C per menit dan ditahan selama 3 menit dengan suhu akhir sebesar 270 °C (Suhendar dan Sogandi 2019).

Sintesis nanokomposit

Sintesis nanokomposit seng oksida – perak (ZnO-Ag) dengan minyak cengkeh dilakukan dengan teknik *One Pot Green Synthesis* menurut Pinjari et al. (2016) dan Azizi et al (2016) dengan kombinasi dan modifikasi. Minyak daun cengkeh sebanyak 15 mL ditambah dengan etanol 50 mL dalam Erlenmeyer 250 mL. Campuran larutan tersebut dihomogenkan dengan Ultrasonikator selama 30 menit. Seng asetat dihidrat 3×10^{-3} M sebanyak 100 mL ditambahkan secara perlahan-lahan dan sedikit demi sedikit pada campuran larutan sebelumnya. Amonia ditambahkan agar larutan mencapai pH 9 dan dihomogenkan dengan ultrasonikator. Campuran larutan tersebut kemudian direaksikan pada *microwave reactor* 300 W dengan suhu 30 °C selama 30 menit. Sebanyak 100 mL perak nitrat (AgNO_3) ditambahkan pada *microwave reactor* sedikit demi sedikit. Variasi penambahan AgNO_3 dilakukan pada waktu 10, 15, 20, 25, dan 30 menit. Campuran kemudian disaring dan dicuci dengan etanol murni hingga warna filtrat memudar. Nanokomposit ZnO-Ag yang terbentuk kemudian dikeringkan pada suhu 130 °C untuk selanjutnya dikarakterisasi.

Karakterisasi nanokomposit

Nanokomposit ZnO-Ag yang terbentuk dikarakterisasi dengan *X-Ray Diffractometer*

(XRD) untuk mengetahui ukuran dan kristalinitas yang terbentuk. Nanokomposit ZnO-Ag dimasukkan dalam plat aluminium berukuran 2 x 2 cm. Plat dialirkan sinar yang berasal dari radiasi $\text{CuK}\alpha$ ($\lambda=1,54060 \text{ \AA}$). Data difraksi dilakukan pada rentang sudut 2θ dan kecepatan baca per detik. Sinar X ditembakkan pada sampel nanokomposit ZnO-Ag sehingga detektor akan berputar dengan rentang sudut difraksi 2θ , dan akan terbaca pada monitor berupa grafik difraktogram. Grafik difraktogram yang didapat kemudian dianalisa dengan *Software Match* versi 3.8.2 dan diterminasi dengan *Origin Pro Software* (Qais et al. 2019).

Karakterisasi morfologi dan komposisi nanokomposit ZnO-Ag dilakukan dengan *Scanning Electron Microscope-Energy Dispersive X-Ray Spectroscopy* (SEM-EDX). Nanokomposit ZnO-Ag dipotong dengan ukuran 2 x 2 cm dengan *diamond blade cutter* tipe JMQ-12 pada kecepatan rendah. Permukaan sampel diampelas pada mesin poles MoPao 2D Grinder Polisher secara berturut-turut dari 120, 400, 800, 1200 hingga 2000. Terakhir sampel dipoles pada kain bludru dan *diamond pasta* 0,25 μ (Sujatno et al. 2015).

Pembuatan kultur bakteri

Sebanyak satu ose koloni bakteri *P. aeruginosa* ATCC 27853 diinokulasikan pada media *tryptic soy broth* (TSB) 100 mL dalam Erlenmeyer 250 mL. Kultur diinkubasi pada suhu kamar dan digoyang pada *rotatory shaker* selama 24 jam. Sebanyak 1 mL kultur tersebut diinokulasikan pada media TSB 50 mL pada Erlenmeyer 100 mL. Kultur diinkubasi selama 18 jam pada suhu kamar dan digoyang dengan *rotatory shaker* (Prasetya, 2017). Kultur ini kemudian dinamakan stok kultur untuk digunakan pada uji aktivitas antibakteri dan antibiofilm.

Uji aktivitas antibakteri

Nanokomposit ZnO-Ag berupa padatan dan dilarutkan dengan DMSO dengan konsentrasi antara lain 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, dan 45 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Bakteri *P. aeruginosa* diinokulasikan pada media 15 mL agar Mueller-Hinton cair pada tabung reaksi kemudian dituang pada cawan Petri steril. Kultur dibiarkan memadat 1–2 jam, dilubangi dengan *cock borer*, dan diberi nanokomposit ZnO-Ag sesuai dengan konsentrasi yang ditetapkan. Kultur selanjutnya diinkubasi pada suhu 37 °C selama

24 jam. Kontrol negatif yang digunakan adalah DMSO, sedangkan kontrol positif yang digunakan adalah meropenem 2 µg. Pengujian ini dilakukan sebanyak tiga kali ulangan.

Uji antibiofilm

Pembentukan biofilm oleh bakteri melalui beberapa mekanisme di antaranya penempelan atau adhesi sejumlah bakteri pada suatu bahan, kemudian sejumlah bakteri tersebut mulai mensekresikan *extracellular polymeric substance* (EPS), dan mulai terjadi ekspansi atau perluasan permukaan hingga terakhir mengalami maturasi atau matang (Walmiki dan Rai 2017). Pada tahap ini nanokomposit ZnO-Ag digunakan untuk mencegah penempelan dan sekresi EPS oleh *P. aeruginosa*. Konsentrasi nanokomposit ZnO-Ag untuk uji aktivitas antibiofilm yang digunakan sama seperti yang digunakan untuk uji antibakteri yakni 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, dan 45 µg mL⁻¹. Sebanyak 200 µL seri konsentrasi nanokomposit ZnO-Ag yang digunakan dimasukkan dalam *microplate* kemudian ditutup dan diinkubasi pada suhu 37 °C selama satu jam agar nanokomposit ZnO-Ag menempel pada *microplate*. Isi *microplate* berupa nanokomposit ZnO-Ag dikeluarkan dan dimasukkan 200 µL suspensi bakteri uji dari stok kultur dengan penambahan 200 µL media *tryptic soy broth* (TSB). Kultur pada *microplate* ditutup dan diinkubasi pada suhu 37 °C dengan rentang waktu 24, 48, 72 dan 96 jam. Kultur pada *microplate* dikeluarkan sesuai dengan waktu inkubasi yang ditentukan, kemudian dicuci dengan akuades sebanyak tiga kali. Sebanyak 200 µL kristal violet 1% dimasukkan pada *microplate* dan diinkubasi selama 15 menit. Pewarna selanjutnya dibilas dengan akuades lagi sebanyak tiga kali dan tambahkan

200 µL etanol 70% dan diinkubasi selama 15 menit. *Microplate* diukur pada panjang gelombang 595 nm menggunakan *microplate reader*. Kontrol negatif yang digunakan adalah DMSO (Costa et al. 2016). Pengujian dilakukan sebanyak tiga ulangan dan dihitung dengan rumus menurut Costa et al. (2016), yaitu:

$$\% \text{ Antibiofilm} = \frac{(OD \text{ kontrol negatif} - OD \text{ sampel})}{OD \text{ kontrol negatif}} \times 100\%$$

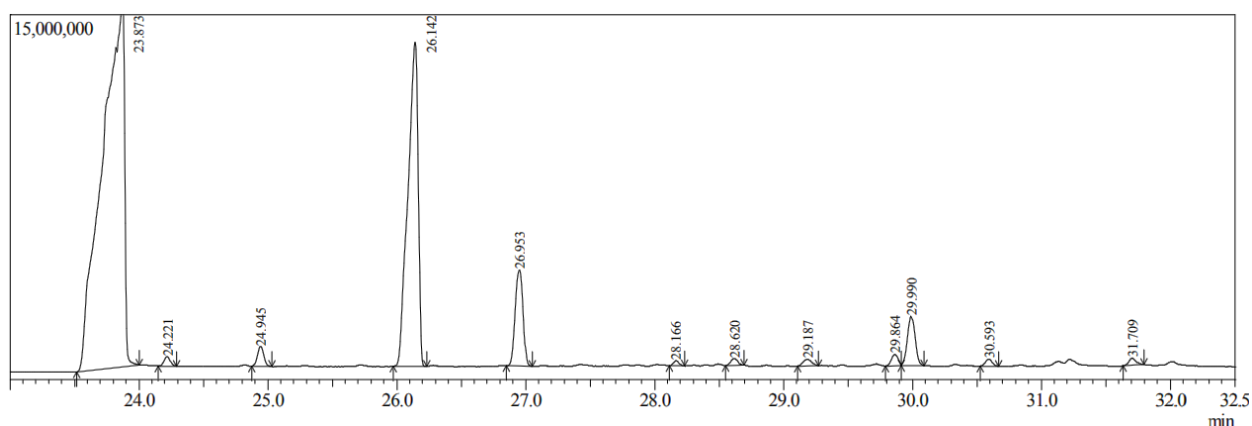
HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil analisa GC-MS pada minyak cengkeh

Berdasarkan hasil analisa minyak cengkeh menggunakan GC-MS (Tabel 1) diperoleh kadar eugenol sebesar 48,72% (Gambar 1). Kadar ini perlu ditingkatkan kemurniannya dengan melakukan proses destilasi fraksinasi pada tekanan 10 mmHg. Hasil destilasi fraksinasi yang kemudian dianalisa menggunakan GC-MS menunjukkan hasil signifikan, dimana kadar

Tabel 1. Kandungan senyawa minyak cengkeh menggunakan GC-MS

No.	Nama Senyawa	Kadar (%)
1.	Eugenol	48,72
2.	Geamcrene D	1,39
3.	Trans-karyofilene	30,7
4.	Alpha-humulene	12,43
5.	Farnesene	0,48
6.	Cadinene	0,46
7.	Ledane	1,42
8.	Karyofilene oksida	3,31
9.	Dodekana	0,57
10.	Patchoulene	0,5



Gambar 1. Kromatogram minyak cengkeh, eugenol pada puncak I sebesar 48,1% dengan waktu retensi 23,873

Tabel 2. Kandungan minyak cengkeh menggunakan GC-MS hasil destilasi fraksinasi

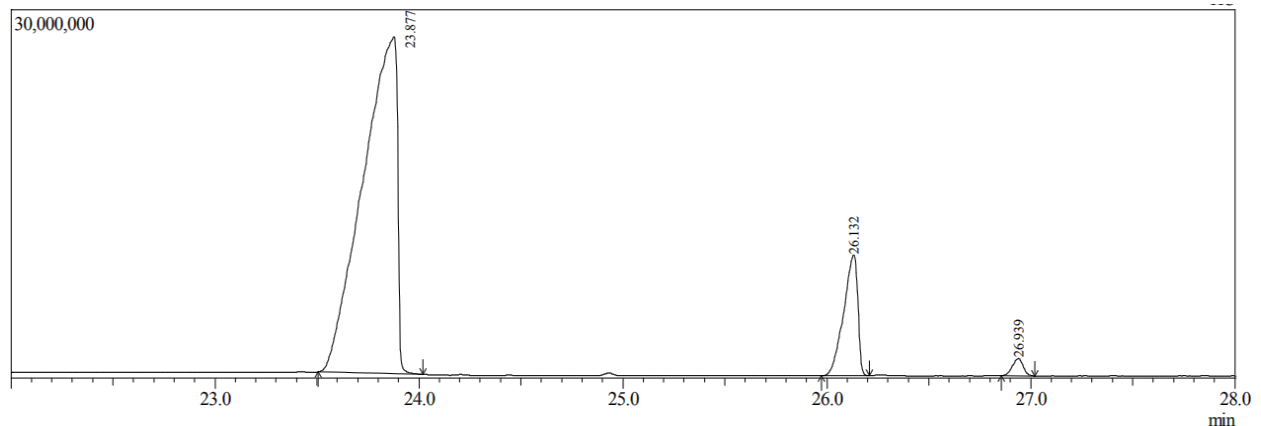
No.	Nama Senyawa	Kadar (%)
1.	Eugenol	73
2.	Trans-Karyofilene	23,9
3.	Alpha-Humulene	3

eugenol meningkat menjadi 73% (Gambar 2) dengan dua kandungan lain yaitu trans-karyofilene dan alpha-humulene (Tabel 2). Hal ini sesuai dengan penelitian Malahayati dan Rahmawati (2014), bahwa untuk meningkatkan kemurnian eugenol pada minyak cengkeh dan sesuai dengan standar *United States Pharmacopeia* (USP) yaitu sebesar 99,5% perlu dilakukan destilasi fraksinasi dengan tekanan terbaik sebesar 10 mmHg. Penelitian tersebut mendapatkan hasil yang sama berupa aroma khas cengkeh dan tidak berwarna. Tekanan pada destilasi fraksinasi sangat mempengaruhi kemurnian, rendemen, bobot jenis, indeks bias, dan putaran optik eugenol secara nyata. Ekstrak daun cengkeh bersifat antibakteri terhadap *Escherichia coli* dan *Streptococcus aureus*

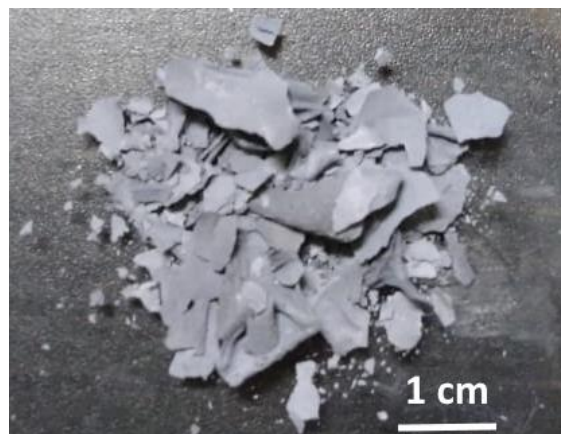
dengan kadar hambat minimal 10% (Ramadhani et al. 2020). Eugenol yang merupakan turunan senyawa fenol juga mampu menghambat bakteri *S. mutans* (Besra dan Kumar 2018) dan *Porphyromonas gingivalis* (Zhang et al. 2017) yang bekerja dengan cara merusak dinding sel bakteri, bertindak sebagai racun untuk protoplasma, dan menonaktifkan serta mendenaturasi protein yang berperan sebagai enzim pada bakteri (Bouarab-Chibane et al. 2019). Walaupun demikian, pada penelitian ini eugenol yang terkandung pada minyak cengkeh hanya berfungsi sebagai bioreduktor terhadap pembentukan nanokomposit ZnO-Ag. Pada tahap akhir, pembentukan nanokomposit ZnO-Ag dicuci dengan etanol murni dan diuapkan pada suhu 130 °C untuk menghilangkan eugenol tersebut (Nisyak et al. 2020).

Hasil analisa XRD pada nanokomposit

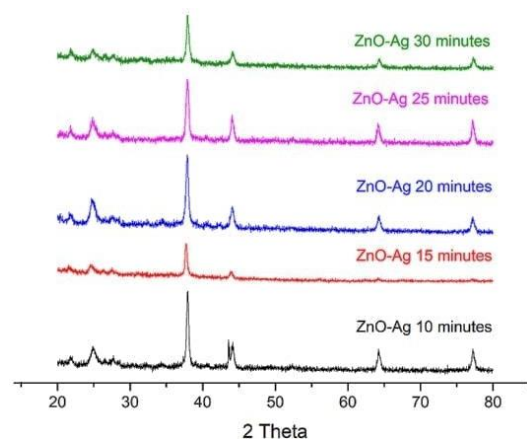
Hasil nanokomposit ZnO-Ag (Gambar 3) selanjutnya dianalisa dengan X-Ray Diffractometer (XRD) (Gambar 4). Hasil



Gambar 2. Kromatogram distilat minyak cengkeh dengan kadar eugenol 73% dengan waktu retensi 23,387



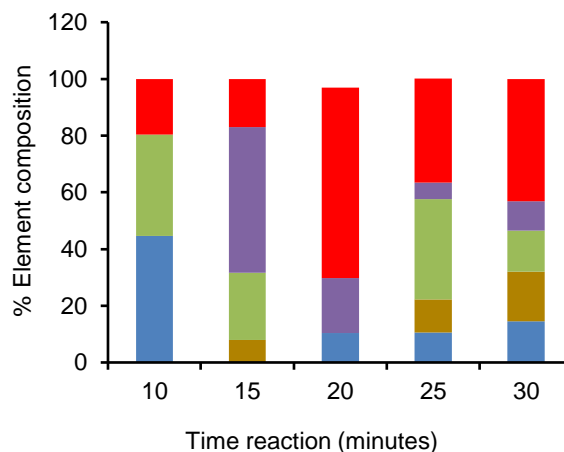
Gambar 3. Hasil nanokomposit ZnO-Ag yang terbentuk secara kasat mata



Gambar 4. Hasil analisa difraktogram ZnO-Ag dengan minyak cengkeh

tersebut menggambarkan bahwa pada sudut 2θ terdapat puncak sudut 38° dan 44° yang dapat dianalisa, dimana Ag teridentifikasi berbentuk bulat dan tidak terdapat perbedaan yang signifikan antara variasi waktu reaksi. Hasil difraktogram ini kemudian diidentifikasi dengan *Software Match* (Gambar 5), yang menunjukkan bahwa nanokomposit yang terbentuk memiliki lima bentuk diantaranya zink oksida, ZnO (zincite), $Zn(OH)_2$ (Wulfingite), $Zn(OH)_2$, dan Ag. Dari gambar tersebut diketahui bahwa waktu reaksi selama 20 menit menunjukkan hasil yang terbaik dengan persentase Ag yang tinggi sebesar 67% dan tidak ada pengotor lain seperti ZnO (zincite) dan $Zn(OH)_2$ (Wulfingite). Nanokomposit dengan ZnO yang tertinggi terdapat pada waktu reaksi 10 menit dengan presentase sebesar 44,7%. Produk samping yang terbentuk pada sintesis nanokomposit ZnO-Ag ini adalah $Zn(OH)_2$ yang paling banyak ditemukan pada waktu reaksi selama 15 menit dan berbentuk trigonal serta $Zn(OH)_2$ (Wulfingite) yang muncul pada waktu reaksi selama 25 menit. Untuk mengetahui rerata ukuran partikel pada nanokomposit ZnO-Ag yang terbentuk dilakukan determinasi dengan persamaan *Scherrer* sedangkan persentase kristalinitas dikalkulasi dengan *Origin Pro* dan *Microsoft Excel software*. Hasil yang didapatkan bahwa semua variasi waktu reaksi sintesis nanokomposit ZnO-Ag memenuhi kriteria dengan ukuran partikel kurang dari 100 nm, dengan ukuran terkecil dan terbaik adalah 19,66 nm pada variasi waktu reaksi 20 menit

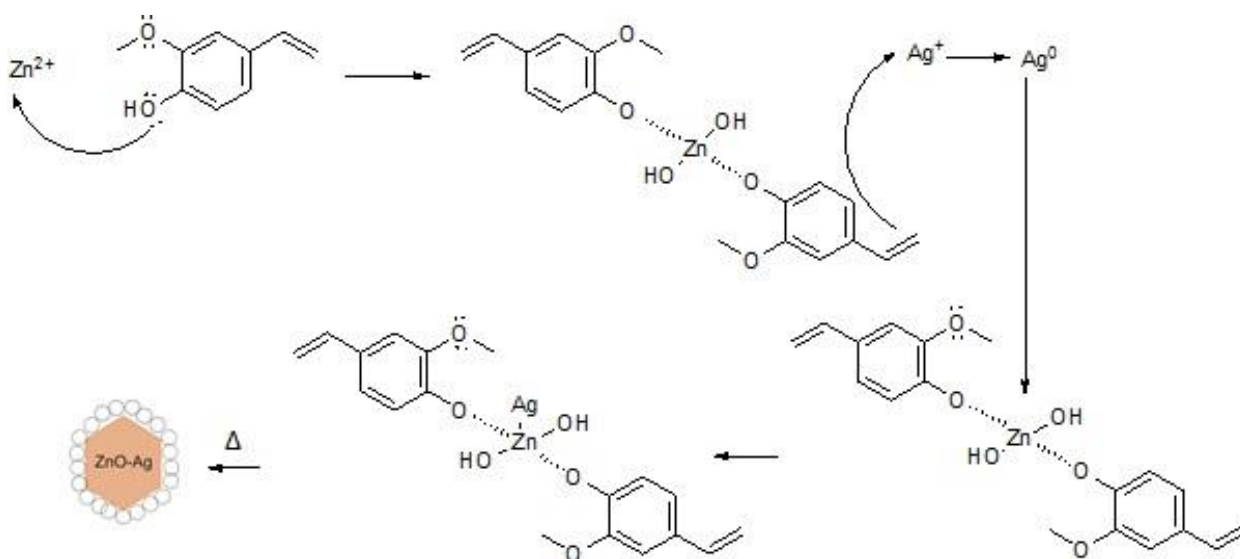
(persentase kristalinitas 28%) (Tabel 3). Oleh karena itu, nanokomposit ZnO-Ag yang digunakan untuk uji aktivitas antibakteri dan antibiofilm adalah metode dengan waktu reaksi 20 menit. Mekanisme reaksi pembentukan ZnO-Ag dengan minyak cengkeh terdapat pada Gambar 6.



Gambar 5. Komposisi nanokomposit ZnO-Ag yang terbentuk dengan *software match*. (■: Ag; ■: $Zn(OH)_2$; ■: $Zn(OH)_2$ (Wulfingite); ■: ZnO (Zincite); ■: ZnO)

Tabel 3. Rerata Ukuran partikel dan persentase kristalinitas nanokomposit ZnO-Ag

Variasi Reaksi (menit)	Rerata Ukuran Partikel (nm)	Kristalinitas (%)
10	36,44	23
15	22,64	15
20	19,66	28
25	32,64	27
30	28,29	20

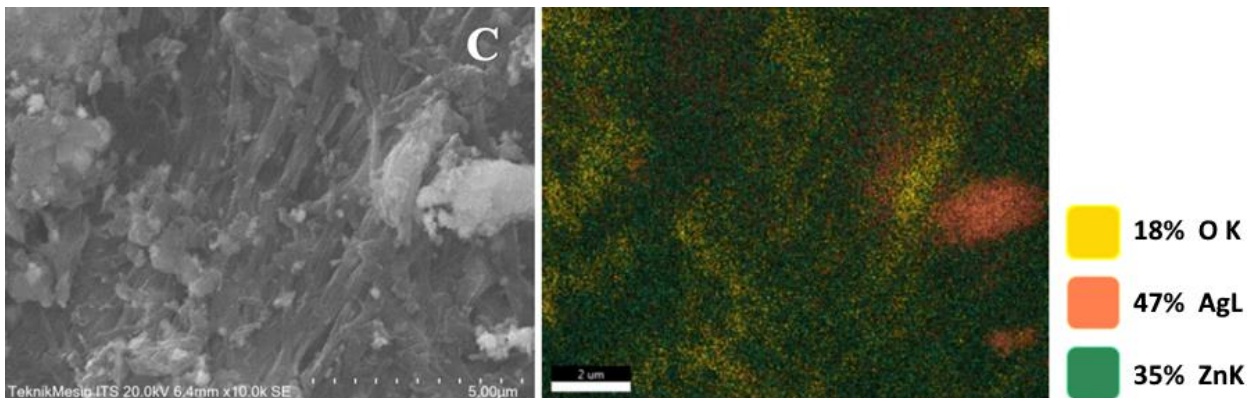


Gambar 6. Mekanisme reaksi nanokomposit ZnO-Ag dengan minyak cengkeh

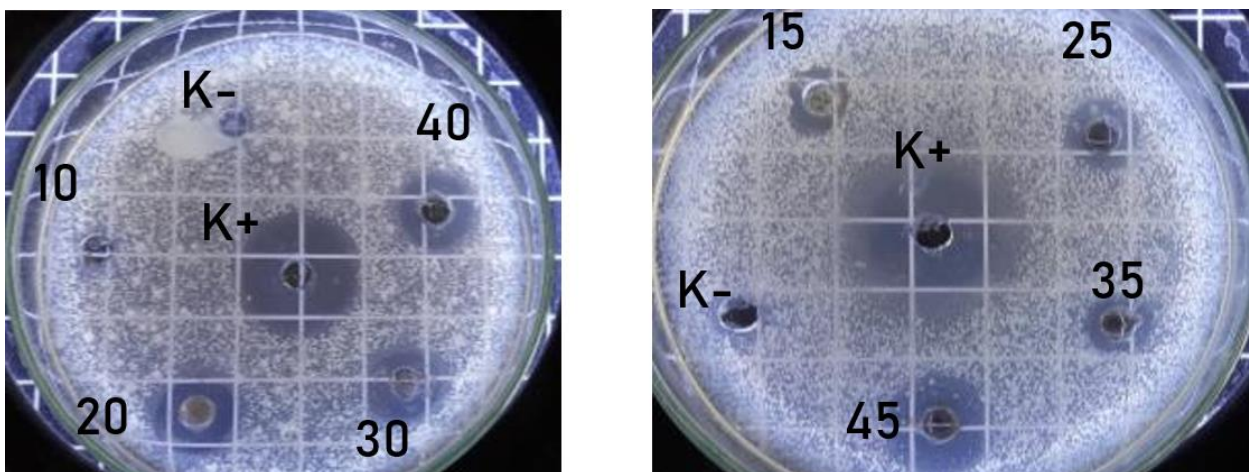
Hasil analisa SEM-EDX pada nanokomposit

Mekanisme sintesis nanokomposit ZnO-Ag menggunakan minyak cengkeh yang memiliki kandungan utama berupa eugenol berfungsi untuk mereduksi ion Ag^+ menjadi Ag^0 , pembentukan nanopartikel Ag, dan mengkomplekskan ion Zn^{2+} (Gambar 6). Hal ini dapat disebabkan karena adanya gugus fungsi hidroksil (-OH), karbonil (C=O), dan ikatan rangkap (=) sebagai pereduksi ion logam, sehingga elektron dari cincin karbon tersebut mereduksi ion logam (Ghosh et al. 2015). Nanokomposit seng oksida-perak (ZnO-Ag) dengan minyak cengkeh yang terbentuk, dimana analisa dengan XRD yang terbaik dilanjutkan dengan analisa morfologinya menggunakan instrumen *Scanning Electron Microscopy-Energy Dispersive X-Ray* (SEM-EDX). Hasil analisa nanokomposit ZnO-Ag dengan variasi waktu 20 menit dengan SEM-EDX (Gambar 7) menunjukkan bahwa perak (Ag) berbentuk bulat yang terdeposit ke dalam seng oksida (ZnO) yang berbentuk fiber. Pembentukan

nanokomposit ZnO-Ag dengan minyak cengkeh dapat tersusun dengan baik pada reaksi waktu 20 menit dapat dilihat melalui hasil XRD yang divisualisasikan dalam bentuk difraktogram (Gambar 4) dan dilanjutkan dengan analisa menggunakan *software match* (Gambar 6). Pada gambar difraktogram hasil analisa XRD menunjukkan bahwa sudut 2θ terdapat puncak sudut 38° dan 44° yang berarti terdapat adanya Ag dan ZnO. Kemudian adanya puncak tersebut dilanjutkan dengan identifikasi dengan *software match* yang menunjukkan lima komponen berbeda, dimana pada waktu reaksi 20 menit tidak ada komponen pengotor lain (hanya terdapat bentuk seng oksida, $Zn(OH)_2$, dan Ag). Hal ini diperkuat dengan adanya hasil dari SEM-EDX (Gambar 7) yang menunjukkan bahwa hanya terdapat unsur berupa Ag (47%), Zn (35%), dan O (18%). Pada perbesaran $10.000 \times$ terlihat bentuk *fiber* yang ditutupi oleh bulatan kecil sehingga dapat dikatakan bahwa ZnO yang terbentuk tertutupi oleh bulatan Ag. Dengan adanya



Gambar 7. Hasil analisa SEM-EDX pada nanokomposit ZnO-Ag



Gambar 8. Hasil uji aktivitas antibakteri nanokomposit ZnO-Ag terhadap *P. aeruginosa* (K+: kontrol positif = meropenem $2 \mu g mL^{-1}$; K-: kontrol negatif = DMSO)

doping Ag ini diperkirakan bahwa Ag menutupi ZnO. Penelitian serupa dengan metode yang berbeda yakni dengan sol gel dan *photochemical* mampu mendeposisikan Ag yang berbentuk bulatan yang terdeposit pada ZnO yang berbentuk *fiber* (Habibi dan Sheibani 2013).

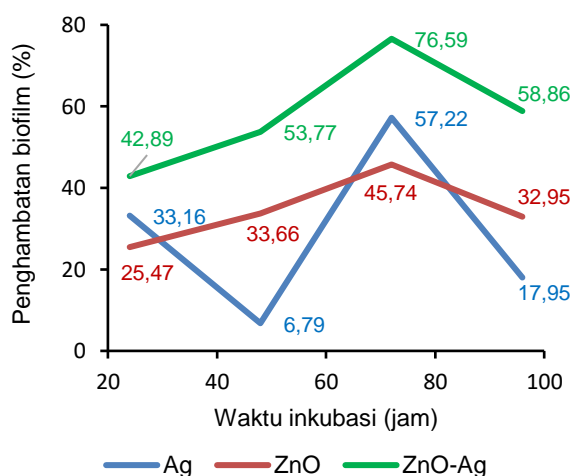
Hasil uji aktivitas antibakteri

Aktivitas antibakteri nanokomposit ZnO-Ag dilakukan dengan metode *cock-borer* dimana nanokomposit ZnO-Ag dibiarkan berdifusi pada media agar Mueller-Hinton. Nanokomposit ZnO-Ag yang terbentuk sebelumnya berupa padatan sehingga harus dilarutkan dengan DMSO. DMSO merupakan pelarut polar aprotik golongan sulfosida yang bersifat netral, tidak bersifat bakterisidal, dan toksisitasnya rendah sehingga tidak akan mengurangi keefektifitasnya suatu obat (Assidqi et al. 2012). Berdasarkan hasil uji aktivitas antibakteri ZnO-Ag terhadap bakteri *P. aeruginosa* (Gambar 8) bahwa konsentrasi $40 \mu\text{g mL}^{-1}$ mampu menghambat pertumbuhan bakteri dengan zona hambat sebesar 14,99 mm dan pada konsentrasi $45 \mu\text{g mL}^{-1}$ mencapai 16,20 mm. Nanokomposit ZnO-Ag terbentuk dengan adanya bantuan minyak cengkeh sebagai bioreduktor. Walaupun minyak cengkeh berperan sebagai antibakteri, namun pada proses pembuatan minyak cengkeh dihilangkan dengan cara dicuci dengan etanol murni dan diuapkan pada suhu $130 \text{ }^\circ\text{C}$ sehingga dipastikan minyak atsiri tersebut hilang dan dibuktikan dengan tidak adanya unsur karbon pada hasil analisa SEM-EDX. Nanokomposit ZnO-Ag mampu menghambat pertumbuhan bakteri *S. mutans* penyebab karang gigi dengan mekanisme merusak membran sel, melepaskan ion K^+ , dan reaktif intraseluler oksigen dan lipid peroksidasi (Wang et al. 2017a). Seng oksida dalam bentuk nanopartikel memiliki aktivitas spektrum luas yaitu dapat menghambat pertumbuhan bakteri *Campylobacter jejuni*, *Salmonella enterica* serovar *Enteritidis*, dan *E. coli* O157:H7 (Xie et al. 2011). Perak dalam bentuk nanopartikel bekerja dengan cara menginduksi stres oksidasi, melepaskan ion metal, dan mekanisme non oksidatif (Wang et al. 2017b). Perlu studi lebih lanjut untuk mengetahui aktivitas nanokomposit ZnO-Ag sebagai antibakteri, namun beberapa studi menduga bahwa mekanisme tersebut

berhubungan dengan eksistensi gugus amino dan karboksil dari nanokomposit yang memiliki afinitas yang kuat terhadap dinding sel bakteri. Ukuran Ag dan ZnO yang berbentuk nano mengakibatkan luas permukaannya meningkat sehingga afinitas semakin tinggi untuk dapat masuk ke dalam sel bakteri. Nanokomposit ZnO-Ag yang apabila telah masuk dalam sel bakteri mampu menghancurkan struktur heliks ganda DNA (Taha et al. 2020).

Hasil uji aktivitas antibiofilm

Uji aktivitas antibiofilm dilakukan dengan metode *microplate* 96 well yang selanjutnya dibaca menggunakan instrumen *microplate reader* pada panjang gelombang 595 nm. Hasil uji aktivitas antibiofilm (Gambar 9) menunjukkan bahwa nanokomposit ZnO-Ag mampu menghambat penempelan biofilm hingga waktu 72 jam dengan persentase penghambatan sebesar 76,59%. Hasil ini lebih efektif dibandingkan dengan penelitian terdahulu, dimana konsentrasi nanopartikel ZnO sebesar $250 \mu\text{g mL}^{-1}$ mampu menghambat pembentukan biofilm pada *S. aureus* dan *Proteus vulgaris* (Mahamuni et al. 2019). Penelitian juga membandingkan aktivitas penghambatan biofilm terhadap nanopartikel Ag dan ZnO yang membuktikan bahwa nanokomposit ZnO-Ag lebih efektif dalam menghambat pertumbuhan biofilm yang dihasilkan *P. aeruginosa*. Nanokomposit ZnO-Ag dapat digunakan sebagai kandidat bahan pelapis peralatan medis untuk mencegah infeksi nosokomial yang disebabkan oleh bakteri pembentuk biofilm. Mekanisme kerja penghambatan



Gambar 9. Uji aktivitas antibiofilm nanokomposit ZnO-Ag pada *P. aeruginosa*

suatu senyawa terhadap biofilm terbagi menjadi tiga yang sesuai dengan pertumbuhan biofilm itu sendiri di antaranya mampu mencegah penempelan biofilm, mencegah maturasi biofilm, dan degradasi biofilm itu sendiri. Pada penelitian ini, nanokomposit ZnO-Ag mampu mencegah penempelan biofilm *P. aeruginosa* selama 72 jam.

KESIMPULAN

Nanokomposit ZnO-Ag dengan minyak cengkeh yang dibuat dengan metode *Green One Pot Synthesis* menghasilkan ukuran partikel sebesar 19,66 nm dengan persentase Ag 47% yang berbentuk bulat dan terdeposit pada ZnO yang berbentuk fiber (Zn 35% dan O 18%). Nanokomposit ZnO-Ag mampu menghambat pertumbuhan bakteri *P. aeruginosa* dengan zona hambat mencapai 14,9 mm dan termasuk kategori aktif menghambat. Nanokomposit ZnO-Ag juga mampu mencegah penempelan biofilm yang dihasilkan *P. aeruginosa* hingga 72 jam dengan persentase penghambatan sebesar 76,59%.

UCAPAN TERIMAKASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Kementrian Riset, Teknologi, dan Pendidikan Tinggi (Kemristek-Dikti) yang telah mendanai penelitian ini pada skema Penelitian Kerjasama Perguruan Tinggi dengan nomer kontrak 113/ SP2H/ LT/ DRPM/ 2019.

DAFTAR PUSTAKA

- Ahmed M, Al Sahli MS, Siddiqui MKJ (2010) Silver nanoparticle applications and human health. *Clin Chim Acta* 411: 1841-1848. doi: 10.1016/j.cca.2010.08.016
- Assidqi K, Tjahjaningsih W, Sigit S (2012) Potensi ekstrak daun patikan kebo (*Euphorbia hirta*) sebagai antibakteri terhadap *Aeromonas hydrophila* secara *in vitro*. *J Mar Coast Sci* 1: 113-124. Corpus ID: 83859722
- Azizi S, Mohamad R, Abdul Rahim R, Moghaddam AB, Moniri M, Ariff A, Saad WZ, Namvab F (2016) ZnO-Ag core shell nanocomposite formed by green

method using essential oil of wild ginger and their bactericidal and cytotoxic effects. *Appl Surf Sci* 384: 517-524. doi: 10.1016/j.apsusc.2016.05.052

- Besra M, Kumar V (2018) *In vitro* investigation of antimicrobial activities of ethnomedicinal plants against dental carries pathogens. *3 Biotech* 8: 257. doi: 10.1007/s13205-018-1283-2
- Bouarab-Chibane L, Forquet V, Lanteri P, Clement Y, Leonard-Akkari L, Oulahal N, Degraeve P, Bordes C (2019) Antibacterial properties of polyphenols: Characterization and QSAR (Quantitative Structure-Activity Relationship) Models. *Front Microbiol* 10: 829. doi: 10.3389/fmicb.2019.00829
- Bustaman S (2011) Potensi pengembangan minyak daun cengkeh sebagai komoditas ekspor Maluku. *Jurnal Litbang Pertanian* 30: 132-139. doi: 10.21082/jp3.v30n4.2011.p132-139
- Carroll KC, Morse SA, Mietzner T, Miller S (2017) Jawetz, Melnick and Adelberg's Mikrobiologi Kedokteran. Edisi 27. Penerbit Buku Kedokteran, Jakarta
- Costa GA, Rossatto FCP, Medeiros AW, Correa APF, Brandelli A, Frazzon APG, Da Motta ADS (2016) Evaluation antibacterial and antibiofilm activity of the antimicrobial peptide P34 against *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus faecalis*. *An Acad Bras Cienc* 90: 73-85. doi: 10.1590/0001-3765201820160131
- Dastjerdi R, Montazer M (2010) A review on the application of inorganic nano-structured materials in the modification of textiles: focus on antimicrobial properties. *Colloids Surf B Biointerfaces* 79: 5-18. doi: 10.1016/j.colsurfb.2010.03.029
- Ding C, Yang Z, Wang J, Liu X, Cao Y, Pan Y, Han L, Zhan S (2016) Prevalence of *Pseudomonas aeruginosa* and antimicrobial-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in patients with pneumonia in mainland China: a systematic review and meta-analysis. *Int J Infect Dis* 49: 119-128 doi: 10.1016/j.ijid.2016.06.014
- El-Shouny WA, Ali SS, Sun J, Samy SM, Ali A (2018) Drug resistance profile and molecular characterization of extended spectrum beta-lactamase (ES β L)-producing *Pseudomonas aeruginosa*

- isolated from burn wound infections. Essential oils and their potential for utilization. *Microb Pathog* 116: 301-312. doi:10.1016/j.micpath.2018.02.005
- Ghosh T, Das AB, Jena B, Pradhan C (2015) Antimicrobial effect of silver zinc oxide (Ag-ZnO) nanocomposite particles. *Front Life Sci* 8: 47-54. doi: 10.1080/21553769.2014.952048
- Gill JS, Arora S, Khanna SP, Kumar KH (2016) Prevalence of multidrug-resistant, extensively drug-resistant, and pandrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* from a tertiary level intensive care unit. *J Glob Infect Dis* 8: 155-159. doi: 10.4103/0974-777x.192962
- Goncalves MDS, Delattre C, Balestrino D, Charbonnel N, Elboutachfai R, Wadouachi A, Badel S, Bernadi T, Michaud P, Forestier C (2014) Antibiofilm activity: A function of *Klebsiella pneumoniae* capsular polysaccharide. *PLoS One* 9: e99995. doi: 10.1371/journal.pone.0099995
- Habibi MH, Sheibani R (2013) Nanostructure silver-doped zinc oxide film coating on glass prepared by sol-gel and photochemical deposition process: Application for removal of mercaptan. *J Ind Eng Chem* 19: 161-165. doi: 10.1016/j.jiec.2012.07.019
- Hall CW, Mah T-F (2017) Molecular mechanisms of biofilm-based antibiotic resistance and tolerance in pathogenic bacteria. *FEMS Microbiol Rev* 41: 276-301. doi: 10.1093/femsre/fux010
- Hisbiyah A, Nisyak K, Prasetya YA, Iftitah ED, Srihardyastutie A (2020) Synthesis of ZnO-Ag nanocomposites through ultrasonication-microwave combination method with clove leaf oil. *IOP Conf Series: Mater Sci Eng* 833: 012070. doi: 10.1088/1757-899X/833/1/012070
- Long SS, Prober CG, Fischer M (2018) Principles and Practice Pediatric Infectious Disease. Fifth Edition. Elsevier, Amsterdam. doi: 10.1016/C2013-0-19020-4
- Mahamuni PP, Patil PM, Dhanavade MJ, Badiger MV, Shadija P G, Lokhande AC, Bohara RA (2019) Synthesis and characterization of zinc oxide nanoparticles by using polyol chemistry for their antimicrobial and antibiofilm activity. *Biochem Biophys Rep* 17: 71-80. doi: 10.1016/j.bbrep.2018.11.007
- Malahayati M, Rahmawati (2014) Optimasi tekanan dan rasio refluks pada destilasi fraksinasi vakum terhadap mutu eugenol dari minyak daun cengkeh (*Eugenia caryophyllata*). *Konversi* 3: 7-17. doi: 10.24853/konversi.3.2.%25p
- Musdalifa K, Purnama MNK, Herawati (2019) Sintesis dan karakterisasi nanopartikel seng oksida (ZnO) dan aplikasinya sebagai agen antibakteri *Staphylococcus aureus* pada kain katun jenis cotton combed. *Indones J Fundamen Sci* 5: 15-25. doi: 10.26858/ijfs.v5i1.9372
- Nisyak K, Prasetya YA, Hisbiyah A, Iftitah ED, Srihardyastutie A (2020) Synthesis of ZnO-Ag with clove oil using ultrasonication method and its antibiofilm activity against *Klebsiella pneumoniae*. *IOP Conf Ser: Mater Sci Eng* 833: 012081. doi: 10.1088/1757-899X/833/1/012081
- Pal RB, Rodrigues M, Datta S (2010) Role of *Pseudomonas* in nosocomial infections and biological characterization of local strains. *J Biosci Technol* 1: 170-179
- Perez-Roses R, Risco E, Vila R, Penalver P, Canigual S (2016) Biological and nonbiological antioxidant activity of some essential oils. *J Agric Food Chem* 64: 4716-4724. doi: 10.1021/acs.jafc.6b00986
- Pinjari DV, Pandit AB, Mhaske ST (2016) Ultrasound assisted green synthesis of zinc oxide nanorods at room temperature. *Indian J Chem Technol* 23: 221-226
- 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: 56-60. doi: 10.29238/teknolabjournal.v6i2.92
- Qais FA, Sahfiq A, Khan HM, Husain FM, Khan RA, Alenzai B, Alsalmeh A, Ahamd I (2019) Antibacterial effect of silver nanoparticles synthesized using *Murraya koenigii* (L.) against multidrug-resistance pathogens. *Bioinorganic Chem Appl* 2019: 4649506. doi: 10.1155/2019/4649506

- Ramadhani A, Saadah S, Sogandi (2020) Efek antibakteri ekstrak daun cengkeh (*Syzygium aromaticum*) terhadap *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*. J Bioteknologi Biosains Indones 7: 203-214. doi: 10.29122/jbbi.v7i2.4146
- Saderi H, Owlia P (2015) Detection of multidrug resistant (MDR) and extremely drug resistant (XDR) *Pseudomonas aeruginosa* isolated from patients in Tehran, Iran. Iran J Pathol 10: 265-271. doi: 10.7508/ijp.2015.04.003
- Salomoni R, Leo P, Montemor AF, Rinaldi BG, Rodrigues MFA (2017) Antibacterial effect of silver nanoparticles in *Pseudomonas aeruginosa*. Nanotechnol Sci Appl 10: 115-121. doi: 10.2147/NSA.S133415
- Suhendar U, Sogandi (2019) Identifikasi senyawa aktif ekstrak daun cengkeh (*Syzygium aromaticum*) sebagai inhibitor *Streptococcus mutans*. Al-Kauniah J Biol 12: 229-239. doi: 10.15408/kauniah.v12i2.12251
- Sujatno A, Salam R, Bandriyana, Dimiyati A (2015) Studi scanning electron microscopy (SEM) untuk karakterisasi proses oksidasi paduan zirkonium. J Forum Nuklir 9: 44-50. doi: 10.17146/jfn.2015.9.1.3356
- Taha A, Ben Aissa M, Da'na E (2020) Green synthesis of an activated carbon-supported Ag and ZnO nanocomposite for photocatalytic degradation and its antibacterial activities. Molecules 25: 1586. doi: 10.3390/molecules25071586
- Walmiki MR, Rai VR (2017) Cell attachment inhibition and anti-biofilm activity of *Syzygium aromaticum*, *Cuminum cyminum* and *Piper nigrum* essential oils against pathogenic bacteria. J Essential Oil Bearing Plants 20: 59-68. doi: 10.1080/0972060x.2017.1287011
- Wang L, Hu C, Shao L (2017b) The antimicrobial activity of nanoparticle: Present situation and prospect for the future. Int J Nanomedicine 12: 1227-1249. doi: 10.2147/IJN.S121956
- Wang S, Wu J, Yang H, Liu X, Huang Q, Lu Z (2017a) Antibacterial activity and mechanism of Ag/ZnO nanocomposite against anaerobic oral pathogen *Streptococcus mutans*. J Mater Sci: Mater Med 28: 23. doi: 10.1007/s10856-016-5837-8
- Xie Y, He Y, Irwin PL, Jin T, Shi X (2011) Antibacterial activity and mechanism of action of zinc oxide nanoparticle against *Campylobacter jejuni*. Appl Environ Microbiol 77: 2325-2331. doi: 10.1128/AEM.02149-10
- Zhang Y, Wang Y, Zhu X, Cao P, Wei S, Lu Y (2017) Antibacterial and antibiofilm activities of eugenol from essential oil of *Syzygium aromaticum* (L) Merr & LM Perry (clove) leaf against periodontal pathogen *Porphyromonas gingivalis*. Microb Pathog 113: 396-402. doi: 10.1016/j.micpath.2017.10.054