



KARAKTERISTIK ANTIBAKTERI NANOCERIA-KITOSAN YANG DISINTESIS MENGGUNAKAN METODE PRESIPITASI

Muhammad Danu Rizkia, dan Iis Nurhasanah*

Departemen Fisika, Fakultas Sain dan Matematika, Universitas Diponegoro, Semarang, Indonesia
*nurhasanah@fisika.fsm.undip.ac.id

Received 2021-10-04, Revised 2022-06-23, Accepted 2023-02-13
Available Online 2023-04-04, Published Regularly April 2023

ABSTRACT

CeO₂ nanoparticles (nanoceria) is a material that possesses antibacterial activity. In this study, nanoceria combined with chitosan to increase its antibacterial property. The characteristic of nanoceria-chitosan was analyzed using X-ray diffractometer, Fourier Transform Infrared (FTIR) and UV-Vis Spectrophotometer. The antibacterial activity of nanoceria-chitosan was tested using the disc diffusion method on *Escherichia coli* bacteria. X-ray diffraction pattern analysis showed that nanoceria-chitosan has a cubic fluorite structure. The incorporation of chitosan in nanoceria was identified at a wave number of 2919 cm⁻¹ from the FTIR spectrum. Nanoceria-chitosan showed a smaller crystallite size, a larger band gap energy and better antibacterial activity than nanoceria.

Keywords: Antibacterial; Ceria; Chitosan; Nanoparticles; Precipitation

ABSTRAK

Nanopartikel CeO₂ (nanoceria) merupakan salah satu material yang memiliki aktivitas antibakteri. Pada penelitian ini nanoceria dikombinasikan dengan kitosan untuk meningkatkan sifat antibakterinya. Karakteristik nanoceria-kitosan dianalisis menggunakan difraktometer sinar-X, *Fourier Transform Infrared* (FTIR) dan Spektrofotometer UV-Vis. Aktivitas antibakteri nanoceria-kitosan diuji menggunakan metode difusi cakram pada bakteri *Escherichia coli*. Analisis pola difraksi sinar-X menunjukkan nanoceria-kitosan memiliki struktur kubik fluorite. Penggabungan kitosan pada nanoceria teridentifikasi pada bilangan gelombang 2919 cm⁻¹ dari spektrum FTIR. Nanoceria-kitosan memiliki ukuran kristalit yang lebih kecil, celah pita energi yang lebih besar dan aktivitas antibakteri yang lebih baik dari nanoceria.

Kata kunci: Antibakteri; Ceria; Kitosan; Nanopartikel; Presipitasi.

PENDAHULUAN

Penggunaan antibiotik yang berlebihan pada penanganan penyakit infeksi akibat bakteri patogen, seperti *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus* menyebabkan peningkatan resistensi bakteri terhadap antibiotik. Hal tersebut menjadi isu global yang mendapat perhatian serius [1-3]. Sintesis nanopartikel dan ekstraksi senyawa yang potensial sebagai antibakteri diperlukan untuk mengurangi jumlah mikroorganisme patogen yang resisten terhadap antibiotik [1,2]. Sampai saat ini, berbagai nanopartikel logam dan oksida logam dikemukakan sebagai antibakteri, diantaranya nanopartikel Cu [3], nanopartikel Ag [4], nanopartikel ZnO, nanopartikel TiO₂ dan nanopartikel CeO₂ (nanoceria) [2,5-9]. Nanopartikel perak memiliki toksisitas yang tinggi terhadap sel normal meskipun pada dosis yang rendah [3]. Nanopartikel ZnO dan TiO₂ menunjukkan aktivitas antibakteri yang efektif dengan pemberian radiasi cahaya ultra violet [10,11].

Nanoceria dikembangkan sebagai antibakteri dengan keunggulan toksisitas rendah dibandingkan Cu [12], Ag [13], ZnO dan TiO₂ [14], bahkan tidak bersifat toksik pada sel mamalia [15]. Berbeda dari nanopartikel logam dan oksida logam lainnya, nanoceria memiliki mekanisme antibakteri unik, dan tidak memerlukan aktivasi eksternal [10,11]. Aktivitas antibakteri nanoceria dihasilkan dari transformasi reversibel antara dua keadaan valensi ($Ce^{4+} \rightarrow Ce^{3+} \rightarrow Ce^{4+}$) pada permukaannya [2,10]. Berbagai metode sintesis menghasilkan nanoceria dengan aktivitas antibakteri berbeda bergantung pada parameter sintesis yang digunakan [2,10]. Selain itu, modifikasi permukaan nanoceria dengan biopolimer dapat meningkatkan sifat antibakteri dan keamanan aplikasinya [2,5,7,16].

Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan nanoceria-kitosan sebagai antibakteri. Nanoceria disintesis menggunakan metode presipitasi. Metode presipitasi dapat menghasilkan nanomaterial dengan peralatan dan proses yang sederhana. Nanoceria-kitosan dibuat melalui pencampuran nanoceria dan larutan kitosan pada temperatur 80°C. Pembentukan nanoceria-kitosan diidentifikasi berdasarkan karakteristik struktur kristal, gugus fungsi dan spektrum absorpsi Uv-Vis. Selanjutnya, aktivitas antibakteri nanoceria-kitosan dianalisis berdasarkan zona hambat terhadap bakteri *Escherichia coli*.

METODE

Bahan

Cerium nitrate hexahydrate (99,9%) dan *Chitosan* (75 – 85%, *deacetylated*) (Sigma Aldrich), amonium hidroksida 25%, isopropanol, asam asetat dan etanol (Merck) dan akuades.

Sintesis nanoceria dan nanoceria-kitosan

Nanoceria disintesis menggunakan metode presipitasi dengan prosedur yang dipaparkan pada literatur [17]. Larutan *cerium nitrate hexahydrate* 0,08 M dibuat dalam campuran pelarut akuades dan isopropanol. Proses presipitasi berlangsung dengan meneteskan amonium hidroksida sampai tercapai pH 10 sambil diaduk menggunakan pengaduk magnetik. Produk presipitasi dicuci menggunakan etanol, kemudian dikeringkan pada temperature 100°C selama 3 jam dan dikalsinasi pada temperature 500°C selama 2 jam. Nanoceria-kitosan dibuat dengan mencampurkan 200 mg nanoceria ke dalam larutan kitosan. Kitosan dilarutkan dalam asam asetat 0,1 M. Campuran diaduk dengan kecepatan konstan pada temperatur 80°C. Selanjutnya dikeringkan selama 3 jam pada temperatur 80°C.

Karakterisasi nanoceria dan nanoceria-kitosan

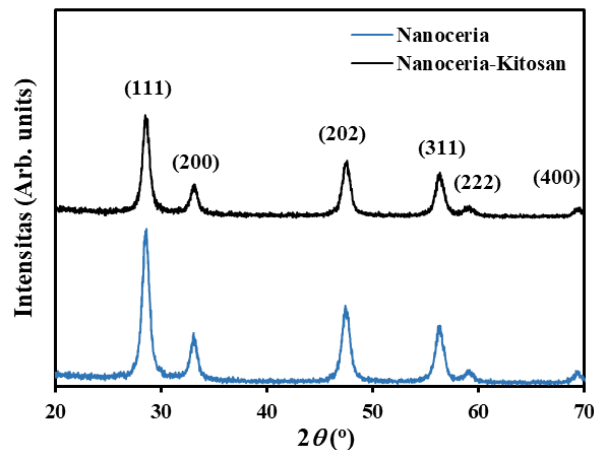
Struktur dan fase nanoceria-kitosan dan nanoceria dikarakterisasi menggunakan difraksi sinar-X (Panalytical Expert Pro) dengan Cu k_{α} ($\lambda = 1,5406 \text{ \AA}$) sebagai sumber sinar-X dan sudut 2θ dari 20° sampai 70° dengan kenaikan $0,02^{\circ}$. *Fourier transform infrared* (Perkin-Elmer) digunakan untuk mengidentifikasi gugus fungsi pada nanoceria-kitosan dan nanoceria. Spektrum absorpsi dari nanoceria-kitosan dan nanoceria diamati menggunakan spektrofotometer UV-Vis (UV mini 1240, Shimadzu). Sifat antibakteri diuji menggunakan metode difusi cakram pada bakteri *Escherichia coli*. Suspensi nanoceria dan nanoceria-kitosan dibuat dalam akuades dengan konsentrasi 10% dan 20%.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Gambar 1 menunjukkan pola difraksi sinar-X nanoceria dan nanoceria-kitosan. Pola difraksi nanoceria dan nanoceria-kitosan menunjukkan puncak-puncak difraksi yang mengindikasikan pembentukan polikristal. Seluruh puncak difraksi yang teramati memiliki kesesuaian dengan puncak-puncak difraksi struktur *fluorite face centered cubic* (JCPDS: 34-0394)^[17,18,19,20]. Intensitas puncak difraksi nanoceria-kitosan yang lebih rendah dengan lebar spektrum pada setengah intensitas maksimum yang lebih besar dari nanoceria menunjukkan penggabungan kitosan pada nanoceria^[16]. Hal ini dapat diamati lebih lanjut dengan menganalisis parameter kisi untuk puncak difraksi tertinggi bidang (111). Parameter kisi dihitung menggunakan Persamaan (1).

$$a = \frac{\lambda \sqrt{h^2+k^2+l^2}}{2\sin\theta} \quad (1)$$

dengan h, k, l adalah indeks Miller, dan θ adalah sudut difraksi. Penghitungan parameter kisi memberikan nilai $5,4074 \text{ \AA}$ untuk nanoceria dan $5,4301 \text{ \AA}$ untuk nanoceria-kitosan. Parameter kisi tersebut mendekati parameter kisi ceria struktur kubik fluorite yaitu $5,4113 \text{ \AA}$ (JCPDS: 34-0394). Dengan demikian nanoceria-kitosan telah berhasil disintesis.



Gambar 1. Pola difraksi sinar-X

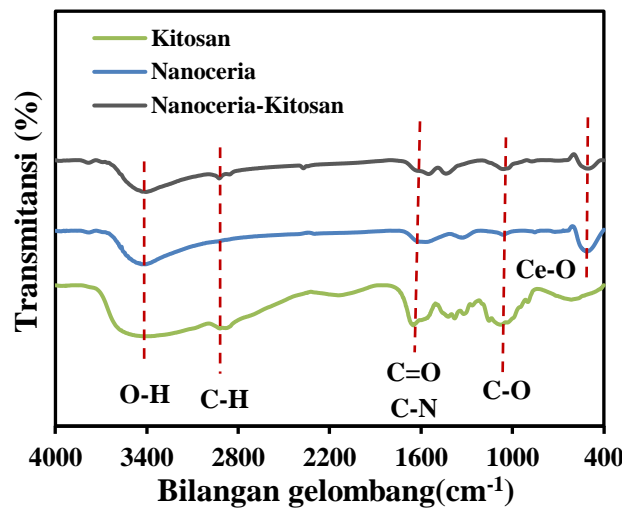
Selanjutnya puncak difraksi dari bidang tertinggi (111) digunakan untuk mengestimasi ukuran kristalit menggunakan persamaan *Scherrer* (Persamaan (2)).

$$D = \frac{K\lambda}{\beta \cos\theta} \quad (2)$$

dengan D adalah ukuran kristalit, λ adalah panjang gelombang sinar-X, θ adalah sudut difraksi, β adalah lebar spektrum pada setengah maksimum, dan K adalah konstanta^[9]. Ukuran kristalit nanoceria dan nanoceria-kitosan berturut-turut adalah 33 nm dan 26 nm . Penggabungan kitosan

pada nanoceria memperkecil ukuran kristalit, sebagaimana dikemukakan untuk nanoceria yang dimodifikasi elemen lain^[6,20]. Kitosan pada permukaan nanoceria dapat menghambat pertumbuhan kristalit.

Pembentukan ceria dapat diidentifikasi lebih lanjut berdasarkan karakteristik gugus fungsi yang dianalisis dari spektrum FTIR. Spektrum FTIR nanoceria dan nanoceria-kitosan ditunjukkan Gambar 2. Secara umum ikatan anorganik logam terbentuk pada bilangan gelombang di bawah 800 cm⁻¹. Vibrasi Ce-O teramati pada pita sekitar 512cm⁻¹ dan 503 cm⁻¹ mengindikasikan pembentukan ceria^[6-8]. Keberadaan kitosan pada nanoceria diidentifikasi dengan pita lebar di sekitar 2919 cm⁻¹ yang menunjukkan ikatan C-H^[7, 17]. Identifikasi gugus-gugus fungsi membuktikan bahwa kitosan tergabung pada nanoceria.



Gambar 2. Spektrum transmitansi FTIR

Sifat optis nanoceria dan nanoceria-kitosan dianalisis berdasarkan spektrum absorbansi pada rentang panjang gelombang 200-800 nm seperti tampak pada Gambar 3(a). Nanoceria maupun nanoceria-kitosan memiliki serapan yang tinggi pada rentang panjang gelombang 200-350 nm. Hal ini menandakan bahwa nanoceria dan nanoceria-kitosan memiliki kemampuan absorpsi kuat terhadap sinar ultraviolet. Puncak absorpsi pada panjang gelombang 312 nm bersesuaian dengan karakteristik puncak absorpsi ceria^[20]. Spektrum absorpsi nanoceria-kitosan yang lebih rendah dari nanoceria menunjukkan penggabungan kitosan pada nanoceria. Selanjutnya celah pita energi nanoceria dan nanoceria-kitosan ditentukan menggunakan metode *Tauc's plot* pada Persamaan 3.

$$\alpha h\nu = C(h\nu - E_g)^n \tag{3}$$

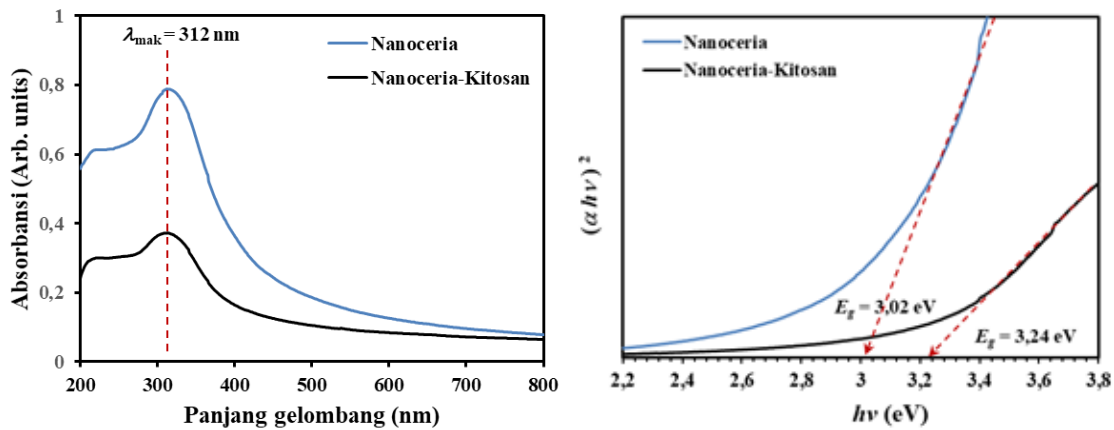
dengan n adalah orde transisi, yaitu: ½ untuk transisi langsung dan 2 untuk transisi tidak langsung, $h\nu$ adalah energi foton, C adalah konstanta, dan α adalah koefisien absorpsi yang dituliskan pada persamaan 4.

$$\alpha = \frac{2,303D\rho}{lc} \tag{4}$$

dengan D adalah kerapatan optik ($D = \log I_o/I$), c adalah konsentrasi suspensi nanoceria, l adalah lintasan optik, ρ adalah kerapatan nanoceria 7,28 g/cm³^[11].

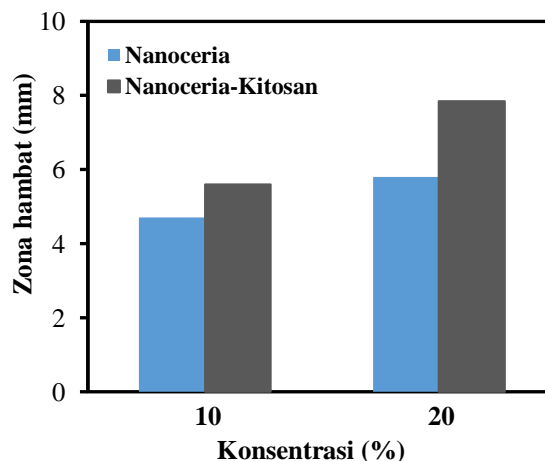
Gambar 3(b) menunjukkan celah pita energi nanoceria dan nanoceria-kitosan berturut-turut adalah 3,02 eV dan 3,24 eV. Celah pita energi nanopartikel dapat mengalami pergeseran ke arah energi yang lebih besar (*blue shift*) atau ke arah energi yang lebih kecil (*red shift*) dari

celah pita energi *bulk*-nya. Nanoceria-kitosan memiliki celah pita energi 3,24 eV yang lebih besar dari celah pita energi nanoceria (3,02 eV) dan ceria *bulk* (3,19 eV) [9, 20]. Hal ini mengindikasikan bahwa penggabungan kitosan mengakibatkan fenomena *blue shift* pada nanoceria [7, 16].



Gambar 3. (a) Spektrum absorpsi Uv-Vis dan (b) Grafik penentuan celah pita energi

Aktivitas antibakteri diuji terhadap bakteri *Escherichia coli* menggunakan metode difusi cakram. Pengujian bertujuan mengamati kerentanan bakteri *Escherichia coli* terhadap nanoceria dan nanoceria-kitosan yang ditentukan dari pembentukan zona hambat. Zona hambat yang besar menunjukkan bahwa bakteri rentan terhadap zat antibakteri. Gambar 4 menunjukkan zona hambat nanoceria dan nanoceria-kitosan dengan konsentrasi 10% dan 20%. Zona hambat nanoceria-kitosan lebih besar dari nanoceria. Hal tersebut menunjukkan penggabungan biopolimer kitosan meningkatkan aktivitas antibakteri nanoceria. Selain itu, zona hambat semakin besar dengan penambahan konsentrasi nanoceria maupun nanoceria-kitosan. Zona hambat sebesar 8 mm diperoleh untuk nanoceria-kitosan pada konsentrasi 20%.



Gambar 4. Aktivitas antibakteri nanoceria dan nanoceria-kitosan

Mekanisme aktivitas antibakteri nanoceria dijelaskan sebagai akibat interaksi langsung antara nanoceria dengan bakteri yang menyebabkan kerusakan membran dan kematian bakteri [7]. Selain itu, permukaan nanoceria yang bermuatan positif membentuk interaksi elektrostatis dengan membran bakteri yang bermuatan negatif [6,9]. Selanjutnya, ketika ion Ce^{4+} dari nanoceria teradsorpsi ke permukaan membran bakteri, terjadi perubahan valensi ion Ce^{4+} menjadi ion Ce^{3+} yang menyebabkan stres oksidatif lipid dan protein dan meningkatkan

permeabilitas membrane ^[21]. Permeabilitas berikatan dengan mesosom dan mengganggu respirasi seluler, replikasi DNA, pembelahan sel, dan meningkatkan area permukaan membran bakteri ^[21]. Kerapatan ion Ce⁴⁺ pada permukaan nanoceria semakin banyak ketika ukuran kristalit lebih kecil. Dengan demikian nanoceria-kitosan dengan ukuran kristalit yang lebih kecil menunjukkan aktivitas antibakteri lebih baik dari nanoceria.

KESIMPULAN

Nanoceria-kitosan berhasil disintesis dengan mencampurkan nanoceria produk presipitasi ke dalam larutan kitosan dan dikeringkan pada temperatur 80°C. Nanoceria-kitosan memiliki stuktur kubik fluorite dengan ukuran kristalit 26 nm dan celah pita energi 3,24 eV. Penggabungan kitosan pada nanoceria meningkatkan aktivitas antibakteri nanoceria dengan zona hambat 8 mm terhadap *Escherichia coli*.

DAFTAR PUSTAKA

1. Liu, J., Wu, D., Zhu, N., Wu, Y., & Li, G. 2021. Antibacterial mechanisms and applications of metal-organic frameworks and their derived nanomaterials. *Trends in Food Science & Technology*, 109, 413–434. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.01.012>
2. Alpaslan, C., Geilich, B.M., Yazici, H., & Webster, T.J. 2017. pH-Controlled Cerium Oxide Nanoparticle Inhibition of Both Gram-Positive and Gram-Negative Bacteria Growth. *Scientific Reports*, 7, 45859. DOI: 10.1038/srep45859
3. Usman, M.S., Ezzat el Zowalaty, M., Shameli, K., Zainuddin, N., Salama, M., & Ibrahim, N.A. Synthesis, characterization, and antimicrobial properties of copper nanoparticles. *International Journal of Nanomedicine*, 8, 4467-4479. doi: 10.2147/IJN.S50837
4. Viet, P. Van, Sang, T.T., Ho, N., Bich, N. & Thi, C.M. 2018. An improved green synthesis method and *Escherichia coli* antibacterial activity of silver nanoparticles. *Journal of Photochemistry & Photobiology B: Biology*, 3, 23-30. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2018.04.002>
5. Latif, M.M, Anwar-ul- Haq, Amin, F., Ajaz-un-Nabi, M., Khan, I.U., & Sabir, N. 2021. Synthesis and antimicrobial activities of Manganese (Mn) and iron (Fe) co-doped Cerium dioxide (CeO₂) Nanoparticles. *Physica B*, 600, 412562. <https://doi.org/10.1016/j.physb.2020.412562>
6. Khadar, Y.A.S., Balamurugan, A., Devarajan, V.P., Subramanian, R. & Kumar, S.D. 2019. Synthesis, characterization and antibacterial activity of cobalt doped cerium oxide (CeO₂:Co) nanoparticles by using hydrothermal method. *Journal of Materials Research and Technology*, 8(1), 267-274. <https://doi.org/10.1016/j.jmrt.2017.12.005>
7. Senthilkumar, R.P., Bhuvaneshwari, V., Ranjithkumar, R., Sathiyavimal, S., Malayaman, V., & Chandarshekar, B. 2017. Synthesis, characterization and antibacterial activity of hybrid chitosan-cerium oxide nanoparticles-as a bionanomaterials. *International Journal of Biological Macromolecules*, 16, 34-41. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.03.139>
8. Surendra, T. V., & Roopan, S.M. 2016. Photocatalytic and antibacterial properties of phytosynthesized of CeO₂ NPs using *Moringa oleifera* peel extract. *JPB*, 16, 67-71. DOI: 10.1016/j.jphotobiol.2016.05.019
9. Arumugam, A. Karthikeyan, C., Hameed, A.S.H., Gopinath, K., Gowri, S. & Karthika, V. 2015. Synthesis of cerium oxide nanoparticles using *Gloriosa superba* L. leaf extract and their structural, optical and antibacterial properties. *Materials Science and Engineering C*, 49, 408–415. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2015.01.042>
10. Zhang, M., Zhang, C., Zhai, X., Luo, F., Du, Y., & Yan, C. 2019. Antibacterial mechanism and activity of cerium oxide nanoparticles. *Science China Materials*, 62(11), 1727-1739.
11. Bazhukovaa, I.N, Sokovnina, S.Y., Ilvesb, V.G., Myshkinaa, A.V., Vazirova, R.A., Pizurovac, N., dan Kasyanovaa, V.V. 2019. Luminescence and optical properties of cerium oxide nanoparticles. *Optical Materials*, 92, 136–142. <https://doi.org/10.1016/j.optmat.2019.04.021>
12. Ingle, A.P., Duran, N., & Rai M. 2014. Bioactivity, mechanism of action, and cytotoxicity of copper-based nanoparticles: A review. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98, 1001–1009. DOI 10.1007/s00253-013-5422-8

13. Asharani, P.V., Low Kah Mun G, & Hande M.P. 2008. Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles in human cells. *ACS Nano*, 3, 279–290. <https://doi.org/10.1021/nn800596w>
14. George, S. Pokhrel, S., Xia, T., Gilbert, B., Ji, Z. Schowalter, M., Rosenauer, A., Damoiseaux, R., Bardley, K.A., Madler, L., & Nel, A.E. 2010. Use of a rapid cytotoxicity screening Approach to engineer a safer Zinc Oxide nanoparticle through Iron doping. *ACS Nano*, 4, 15–29. <https://doi.org/10.1021/nn901503q>
15. De Marzi, L., Monaco, A., & De Lapuente, J. 2013. Cytotoxicity and genotoxicity of ceria nanoparticles on different cell lines *in vitro*. *International Journal of Molecular Sciences*, 14, 3065–3077. doi: 10.3390/ijms14023065
16. Fang, X. & Song, H., 2018. Synthesis of cerium oxide nanoparticles loaded on chitosan for enhanced auto-catalytic regenerative ability and biocompatibility for the spinal cord injury repair. *Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology*, 18, 74-87. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2018.11.016>
17. Nurhasanah, I., Safitri, W., Arifin, Z., Subagio, A., & Windarti, T. 2018. Antioxidant activity and dose enhancement factor of CeO₂ nanoparticles synthesized by precipitation method. *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*, 432, 012031. doi:10.1088/1757-899X/432/1/012031
18. Sifontes, A.B., Gonzales, G., Ochoa, J.L., Tovar, L.M., Zoltan, T., & Canizales, E. 2011. Chitosan as template for the synthesis of ceria nanoparticles. *Materials Research Bulletin*, 46. 1794-1799. <https://doi.org/10.1016/j.materresbull.2011.07.049>.
19. Zhang, L., Zhu, T., Liu, X., & Zhang, W. 2016. Simultaneous oxidation and adsorption of As(III) from water by cerium modified chitosan ultrafine nanobiosorbent. *Journal of Hazardous Materials*, 308, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2016.01.015>
20. Truffault, L., Ta, M.T., Devers, T., Konstantinov, K., Harel, V., Simmonard, C., Andreazza, C., Nevirkovets, I.P., Pineau, A., Veron, O., & Blondeau, J.P. 2010. Application of nanostructured Ca doped CeO₂ for ultraviolet filtration. *Materials Research Bulletin*, 45, 527-535. <https://doi.org/10.1016/j.materresbull.2010.02.008>
21. Rajan, A.R., Vilasb, V., Rajanc, A., Johna, A., & Philipa, D. 2020. Synthesis of nanostructured CeO₂ by chemical and biogenic methods: Optical properties and bioactivity. *Ceramics International*, 46(9), 14048-14055. <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2020.02.204>