

POTENSI HIBRID *GOLD NANOPARTICLES* DAN ANTIBIOTIK *VANKOMISIN* UNTUK MENGATASI *MULTI DRUG RESISTANT BACTERIA* (MDR)

Nur Hikmatul Auliya¹, Ajeng Dian Pertiwi², Edy Kurniawan³

^{1,2}Program Studi D III Farmasi Politeknik Medica Farma Husada Mataram

³Program Studi DIII Analisis Teknologi Laboratorium Politeknik Medica Farma Husada Mataram

Email : nurhikmatulauliya.ziya@gmail.com

Abstract

Antibiotic-resistant bacteria are responsible for the majority of infections worldwide. The β -Lactam antibiotics work by inhibiting penicillin-binding proteins (PBPs) which are currently resistant to MRSA (Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*). To solve this problem, drug delivery systems methods should be developed to overcome bacterial resistance. Nanoparticles offer a system which can improve bioavailability, efficacy, and specificity works by pharmaceutical drugs. In this study, hybridization between gold nanoparticles and vancomycin antibiotics was carried out followed by the characterization of hybrid by FT-IR and UV-Vis determination. Antibacterial activity testing also was done by the Kirby-Bauer method. The results showed that the vancomycin was resistance against MRSA, whereas hybridization process by gold nanoparticles increased its ability. The hybrid showed antibacterial activity against MRSA. The test showed the ability of hybrid to inhibit MRSA at the concentration of 100 ppm, 500 ppm and 1000 ppm with a clear zone of 13 mm, 24 mm and 28 mm respectively.

Key word : MRSA, Hibrid Gold-Vankomisin, *Drug Delivery System*

PENDAHULUAN

Resistensi bakteri terhadap antibiotik terus meningkat dan menyebabkan masalah serius dalam pengobatan infeksi oleh bakteri, khususnya penyakit yang disebabkan oleh bakteri *Staphylococcus aureus* yang resisten terhadap antibiotik methicillin (MRSA), yang bertanggung jawab atas mayoritas infeksi yang terdapat di rumah sakit, komplikasi klinis, dan kematian karena infeksi di seluruh dunia (Turos et al., 2007). Bakteri ini mengakibatkan hilangnya efektivitas antibiotik yang umum digunakan seperti penisilin dan obat dari golongan β -laktam lainnya seperti antibiotik vancomycin dan beberapa Glikopepetida (Autiero, Costantini, Colona 2009), sehingga semakin menambah permasalahan kesehatan dan diperlukan

perbaikan dalam perancangan (*design*), penemuan dan sistem pengantaran obat (*Drug Delivery System*). Penisilin dan Meticillin adalah antibiotik β -laktam yang bekerja dengan menghambat protein pengikat penisilin (PBPs). PBP (*penicillin-binding proteins*) terlibat dalam sintesis peptidoglikan, polimer yang sangat penting yang mengelilingi enzim seluler dan sangat penting untuk kelangsungan hidup bakteri (Autiero, Costantini, Colona 2009)

Tantangan utama dalam mengobati penyakit infeksi oleh bakteri resisten antibiotik seperti MRSA adalah menghentikan infeksi di tempat inisiasi, dimana obat yang larut dalam air biasanya memiliki akses yang buruk di daerah tubuh. Namun, pengembangan agen lipofilik untuk melawan infeksi memiliki efektivitas terbatas karena masalah absorpsi

(penyerapan) obat dan penghantaran (*delivery*) yang disebabkan oleh kelarutan air (*solubility*) dan biodistribusi yang rendah (*poor biodistribution*) (Patel & Amiji 1996). Kemampuan untuk mengantarkan (*delivery*) antibiotik ke daerah infeksi pada jaringan lemak di mana biofilm mikroba sering berkembang akan menentukan intervensi selanjutnya. Turos et al. (2007) *Drug Delivery System* (sistem penghantaran obat) seperti liposom dan nanopartikel menawarkan sistem penghantaran yang menjanjikan untuk meningkatkan bioavailabilitas (ketersediaan), *efficacy* (efektif), dan spesifitas senyawa obat-obat farmasi secara umum.

Pendekatan nonkovalen umumnya digunakan dalam biokonjugasi Nanopartikel karena tidak diperlukan reaksi kimiawi (Sapsford 2013). Interaksi nonkovalen antara Nanopartikel dan obat-obatan mempengaruhi cara imobilisasi dan pemberian obat (Doane & Burda 2013) dan ikatan ikatan elektrostatik (Adeli et al., 2011), hidrofobik-hidrofilik (Chen & Jiang 2011). Keseimbangan antara semua kekuatan ini dapat memberikan sistem eksklusif berdasarkan nanopartikel (Doane & Burda 2013). Adeli et al., 2011 telah mensintesis sistem pengiriman obat (*Drug Delivery*) berbasis nanostruktur hibrida (DDSs) yang terdiri dari inti AuNP (Gold Nanoparticles). Struktur nano hibrida distabilkan oleh interaksi elektrostatik antara AuNPs dan poliotaxane dan menghasilkan efek toksik yang jauh lebih baik dari efek obat tanpa nanopartikel.

Dalam proses hibridisasi, inti gold (AuNPs) distabilkan oleh sitrat yang kemudian di fungsikan (*functionalized*) dengan asam lipoic dan asam mercaptohexadecanoic, sehingga membentuk inti gold yang stabil dan mampu berikatan dengan molekul obat, aptamer, siRNA dan antibody (Zahrah 2016). Hibridisasi gold nanopartikel-

antibiotik meticillin terutama untuk mengatasi bakteri resistan seperti MRSA dan evaluasi efek hybrid obat tersebut tersebut belum diselidiki. Sehingga penelitian tentang sintesis dan evaluasi meticillin yang terikat secara hybrid dengan gold nanopartikel perlu dilakukan terhadap jenis bakteri-bakteri resistan seperti MRSA, Vancomycin-Resistant Enterococci (VRE), Extended-spectrum β -lactamase (ESBLs) oleh bakteri Gram-negative.

METODOLOGI PENELITIAN

Sintesis *citrate-stabilized gold nanoparticles* (AuNPs)

Koloid emas disintesis dengan mereduksi natrium sitrat HAuCl₄ dengan menggunakan metode Turkevich *et al.* (Turkevich 1951) yang dimodifikasi oleh Zahrah (2016).

Sintesis Hibrida Meticillin-AuNPs

Functionalized Nanopartikel emas disintesis dengan pendekatan dua langkah yang dijelaskan oleh Lin et al. (2004) dengan modifikasi oleh Zahrah (2016). Larutan natrium hidroksida (NaOH, 0,5 M) pertama kali ditambahkan pada nanopartikel emas koloid untuk mengatur pH menjadi 7,4. Kemudian, larutan asam (\pm) - α -lipoic (LA) (0,0028g) dalam etanol (0,4 mL) ditambahkan, dan campuran diaduk pada kecepatan ringan pada suhu kamar selama 18 jam. Kemudian larutan 16-mercaptohexadecanoic acid (16-MHDA) (0.0028g) ditambahkan ke dalam campuran dengan pengadukan lebih lanjut selama 18 jam pada suhu kamar. Sampel disentrifugasi 5 kali pada 15700 g selama 15 menit untuk menghilangkan kelebihan Thiol. Sampel ini adalah thiol @ AuNPs. Setelah itu, untuk setiap sampel, larutan thiol @ AuNPs (3,5 mL) ditambahkan dengan 1,5 mL Meticillin (3 mg Meticillin dalam 10 mL etanol). Sampel dibiarkan diaduk pada suhu kamar untuk beberapa kali. Kemudian, sampel

disentrifugasi 5 kali pada 15700 g selama 15 menit dan disimpan pada suhu 4 ° C sampai diperlukan untuk karakterisasi dan pengujian. Sampel ini adalah hibrida Meticillin-AuNPs.

Identifikasi Hibrid-Meticillin AuNPs dengan UV-Vis dan FTIR

Identifikasi menggunakan UV-Vis. Semua sampel NP disentrifugasi pada 15700 g selama 15 menit dan dicuci dengan air Milli-Q. Prosedur ini diulang sebanyak 5 kali. Kemudian, pelet nanopartikel dilepaskan dalam air Milli-Q. Sampel yang sangat terkonsentrasi diencerkan oleh air Milli-Q untuk menyesuaikan diri dengan keterbatasan teknik pengukuran. Koefisien ekstensi molar (ϵ) AuNPs pada 523 nm = $9,21 \times 10^8$ M⁻¹ Cm⁻¹. Instrumen di nol kan dengan Mili Q water dan absorbansi sampel diukur. Selanjutnya Hibrid-Meticillin AuNPs juga di determinasi dengan metode yang sama (Zahrah 2016)

Identifikasi dengan FT-IR. FT-IR merupakan pengukuran energi dari getaran ikatan molekul, sehingga digunakan untuk menentukan kelompok fungsional dalam molekul dan mengidentifikasi senyawa individu dalam campuran. Dalam penelitian ini, spektroskopi FT-IR digunakan untuk menyelidiki struktur dari hybrida dan partikel yang disiapkan. Sampel disiapkan menggunakan cakram kalium bromida (KBr). Sekitar 0,02 g KBr digiling dan ditempatkan di tempat sampel dan digunakan sebagai background. Untuk mempersiapkan sampel cakram, kira-kira 8 mg sampel digiling dengan 0,02 g KBr dan ditempatkan di tempat sampel untuk dianalisa (Zahrah 2016).

Aktivitas Antibakteri dengan Metode Kirby-Bauer

Untuk mengetahui aktivitas Hibrid Meticillin-AuNPs dalam menghambat

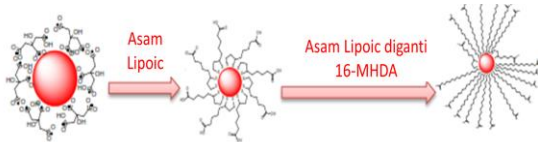
pertumbuhan bakteri MRSA (*Metichillin Resistant Staphylococcus aureus*) dilakukan uji secara in-vitro dengan adanya dan tidak adanya penambahan β -laktamase protein. Peralatan dan bahan yang digunakan untuk uji zona daya hambat disterilisasi terlebih dahulu dengan autoklaf. Metode pengerjaan dilakukan secara steril di ruang *laminar air flow* untuk mencegah kontaminasi. Uji aktivitas dilakukan dengan menggunakan kertas cakram dengan diameter 6 mm dan diteteskan 1, 3, 5 μ L Hibrid Meticillin-AuNPs pada kertas cakram, kemudian diletakan diatas media *Mueller Hinton Agar* yang telah diinokulasi dengan bakteri MRSA sebanyak 0,1 mL dengan kepadatan bakteri setara dengan 1 Mc. Farland (3×10^8 sel/mL). Masing-masing perlakuan pada tiap konsentrasi diulang 3 kali, kemudian diinkubasikan selama 24 jam pada suhu 37°C dalam inkubator. Diameter zona hambatan yang dihasilkan pada uji ini kemudian diamati (Arullappan *et al*, 2009).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hibridisasi

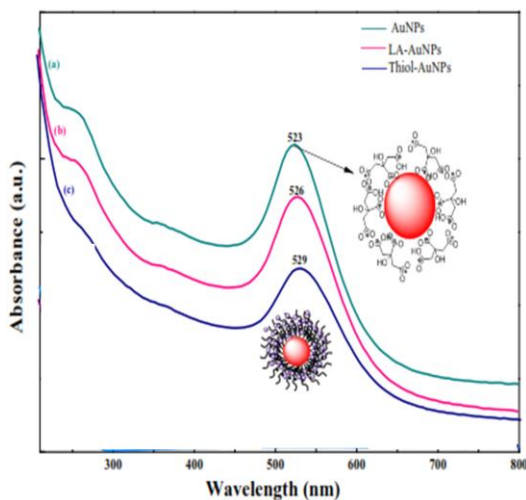
Dalam proses hibridisasi, sitrat dan anion dari klorida pada permukaan gold nanopartikel dengan grup disulfide setelah menambahkan asam lipoic pada colloid gold pada step pertama. Telah diketahui bahwa asam lipoic berhadapan dengan grup karboksilat dan molekul disulfide S-S. atomsulfur menunjukkan afinitas kuat terhadap gold pada pH tinggi, jadi posisi negative yang menstabilkan AuNPs dan ikatan disulfide membuat dua ikatan S-Au. Formasi ini menghambat asam lipoic mendapat desopsi kinetic sehingga berdampak pada formasi stabil dari inti emas. Step selanjutnya adalah dengan modifikasi ligan antara rantai pendek asam Lipoic dengan rantai panjang 16-MHDA. 16-MHDA mengikat AuNPs dengan ikatan

thiol tunggal dan menyediakan stabilitas pada inti dan agregasi yang tidak terkontrol (Adaptasi dari Al halili 2016).



Gambar 1 Proses hibridisasi gold nanopartikel dengan molekul obat (Adaptasi dari Al halili 2016).

Karakterisasi Gold Nanopartikel dengan UV-Vis

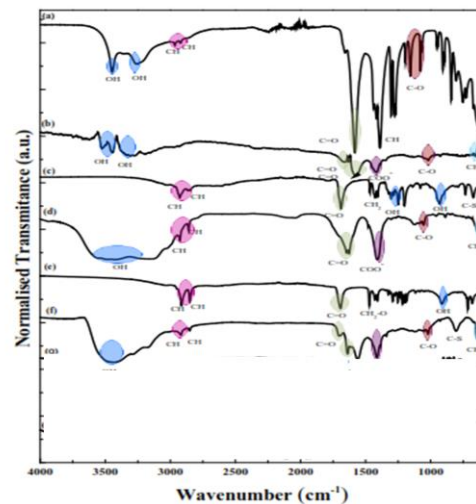


Gambar 2 Spektrum absorbansi dari proses stabilisasi partikel emas.

Gambar tersebut menunjukkan spectrum UV-Vis dari gold nanopartikel yang distabilisasi dengan sitrat. Karakteristik absorbansi dari SPR (surface Plasmon resonance) dari AuNPs berada pada 523 nm. Absorbansi tersebut menunjukkan formasi partikel kecil (sekitar 20 nm) yang sama seperti yang dilaporkan oleh literature lain (Abdelhalim, Mady & Ghannam 2012). Selanjutnya spectrum berikutnya menunjukkan perbedaan sedikit dalam spectrum UV-Vis, dimana peak gelombang

berubah menjadi 526 nm (Lin 2004) karena adanya perlekatan LA pada Thiol-AuNPs yang selanjutnya berpindah kembali pada 529 nm karena suksesnya pergantian LA oleh 16-MHDA pada permukaan gold nanopartikel. Secara umum ukuran dan bentuk gold nanopartikel mempengaruhi posisi dan peak dari SPR. Lebih lanjut, ketika ukuran di tingkatkan, maksimum absorbansi akan bergeser ke panjang gelombang yang lebih panjang.

Karakterisasi menggunakan FT-IR

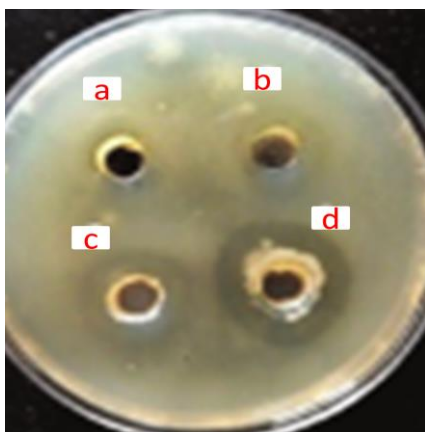


Gambar 3 Nilai spectrum dari proses stabilisasi partikel emas

Spectrum dari trisodium sitrat menunjukkan karakteristik peak yang terpantau, peak terletak pada 3445 cm^{-1} dan 3264 cm^{-1} dikarenakan oleh vibrasi O-H, namun peak juga berada pada 2965 cm^{-1} dan 2920 cm^{-1} karena vibrasi simetris dan tidak simetris dari grup metilen. Peak pada 1579 cm^{-1} berkaitan dengan vibrasi tidak simetris oleh C=O. Band pada 1392 cm^{-1} berkaitan dengan ikatan C-H. Band pada 1273 cm^{-1} , 1193 cm^{-1} , 1154 cm^{-1} , 1080 cm^{-1} dan 949 cm^{-1} menunjukkan vibrasi C-O (Thottoli & Unni 2013). Spectrum pada AuNPs yang distabilisasi oleh sitrat menunjukkan absorpsi band C=O pada 1660 cm^{-1} , juga

absorpsi kuat pada 1579 cm^{-1} oleh C=O dan vibrasi simetris pada COO⁻ pada 1414 cm^{-1} . Vibrasi C-O pada 1020 cm^{-1} dan deformasi C-H pada 650 cm^{-1} . Karakteristik absorpsi pada 3445 cm^{-1} dan 3292 cm^{-1} berkaitan dengan kehadiran grup hidroksil (-OH).

Hasil Uji Antibakteri dari Hibrid AuNPs-Antibiotik



Gambar 4 Uji Antibakteri dari Hibrid dan Kontrol terhadap MRSA (a) Kontrol (b) 100 ppm hibrid (c) 500 ppm hibrid (d) 1000 ppm hibrid.

Dari penelitian didapatkan pada konsentrasi 100 ppm hibrid didapatkan zona bening sebesar 12 mm, konsentrasi 500 ppm didaprkan 24 mm dan pada konsentrasi 1000 ppm didapatkan zona bening sebesar 28 mm. Hasil ini menunjukkan perbedaan yang signifikan antaran penggunaan antibiotic vankomisin tanpa emas nanopartikel dan menggunakan nanopartikel. Antibiotic menjadi tidak resisten terhadap bakteri MRSA.

KESIMPULAN

Hibridisasi Gold nanopartikel dengan antibiotic vankomisin telah berhasil dibuat dan mampu menghambat bakteri MRSA, dimana sebelumnya antibiotic tersebut resisten dengan MRSA

UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih kami ucapkan kepada Ristekdikti untuk pembiayaan penelitian dosen pemula tahun 2018. Terima kasih juga disampaikan kepada Politeknik Medica Farma Husada yang merupakan naungan institusi dalam penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Adeli, M., et al., *Polyrotaxane/gold nanoparticle hybrid nanomaterials as anticancer drug delivery systems*. Journal of Materials Chemistry, 2011. **21**(46): p. 18686-18695.
- Arullappan, S., Z. Zakaria, and D.F Basri. 2009. Preliminary Screening of Antibacterial Activity Using Crude Extracts of *Hibiscus rosa sinensis*. Tropical Life Sciences Research, 20 (2): 109-118.
- Boisselier, E. and D. Astruc, *Gold nanoparticles in nanomedicine: preparations, imaging, diagnostics, therapies and toxicity*. Chemical society reviews, 2009. **38**(6): p. 1759-1782.
- Burda, C., et al., *Chemistry and properties of nanocrystals of different shapes*. Chemical reviews, 2005. **105**(4): p. 1025-1102.
- Chen, G. and M. Jiang, *Cyclodextrin-based inclusion complexation bridging supramolecular chemistry and macromolecular self-assembly*. Chemical Society Reviews, 2011. **40**(5): p. 2254-2266.
- Cordon CS, P.M., Melo CM, Pinhal MAS, Suarez ER., *Nanoparticles as*

- platforms of molecular delivery in diagnosis and therapy*. OA Cancer 2013. **1**(2): p. 15.
- Doane, T. and C. Burda, *Nanoparticle mediated non-covalent drug delivery()*. Advanced drug delivery reviews, 2013. **65**(5): p. 607-621.
- Ibrahem, S. 2010. Methicillin Resistance in Staphylococci: Horizontal Transfer of Mobile Genetic Element (SCCmec) between Staphylococcal Species. Faculty of Medicine. University of Helsinki.
- Karshikoff, A., *Non-covalent interactions in proteins*. 2006: World Scientific.
- Grabar, K.C., et al., *Preparation and characterization of Au colloid monolayers*. Analytical chemistry, 1995. **67**(4): p. 735-743.
- Kusmiyati, dkk. 2006. *Uji Aktivitas Senyawa Antibakteri dari Mikroalga Porphyridium cruentum*. Cibinong : Pusat Penelitian Bioteknologi, Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LPI).
- Murray, C., D.J. Norris, and M.G. Bawendi, *Synthesis and characterization of nearly monodisperse CdE (E= sulfur, selenium, tellurium) semiconductor nanocrystallites*. Journal of the American Chemical Society, 1993. **115**(19): p. 8706-8715.
- Prabhu, R.H., V.B. Patravale, and M.D. Joshi, *Polymeric nanoparticles for targeted treatment in oncology: current insights*. International Journal of Nanomedicine, 2015. **10**: p. 1001-1018.
- Sapsford, K.E., et al., *Functionalizing Nanoparticles with Biological Molecules: Developing Chemistries that Facilitate Nanotechnology*. Chemical Reviews, 2013. **113**(3): p. 1904-2074.
- Sperling, R.A. and W.J. Parak, *Surface modification, functionalization and bioconjugation of colloidal inorganic nanoparticles*. Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences, 2010. **368**(1915): p. 1333-1383.
- Strateva, T & Yordanov, D. 2009. Pseudomonas aeruginosa – a phenomenon of bacterial resistance. Journal of Medical Microbiology. Vol. 58. Pp.1133–1148
- Turkevich, J., P.C. Stevenson, and J. Hillier, *A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold*. Discussions of the Faraday Society, 1951. **11**: p. 55-75.
- Turos, E., Reddy, S. K., Greenhalgh, K., Ramaraju, P., Abelylath, S. C., Jang, S., Dickey, S., Lim, D.V 2007 “ Penicillin-bound polyacrylate nanoparticles:restoring the activity of β -lactam antibiotics against MRSA. Biorganic Medical Chemistry Letter, vol. 17, pp. 3468-3472.
- Ventola, C.L., *The Nanomedicine Revolution: Part 2: Current and Future Clinical Applications*. Pharmacy and Therapeutics, 2012. **37**(10): p. 582-591.
- Wojcik, M., et al., *Enhancing anti-tumor efficacy of Doxorubicin by non-covalent conjugation to gold*

nanoparticles - in vitro studies on feline fibrosarcoma cell lines. PLoS One, 2015. 10(4): p. e0124955.

Zahrah, A 2016," Designing a novel drug delivery system based on gold nanoparticles for breast cancer therapy". Dissertation. Flinders University. South Australia