

Bioreduksi Limbah AgNO₃ Sisa Proses Pewarnaan Perak (*Silver staining*) dengan Menggunakan Eksopolisakarida *Bacillus subtilis***Suharyono¹, Alifah Mubarakah^{2*}**¹Laboratorium Struktur dan Perkembangan Hewan (SPH),² Fasilitas Penelitian Bersama (FALITMA), Fakultas Biologi, Universitas Gadjah Mada, email : alifahm@ugm.ac.id

Submisi: 23 Agustus 2019; Penerimaan: 25 Juni 2020

ABSTRAK

Limbah perak (Ag⁺) merupakan limbah laboratorium cair yang dihasilkan dari proses pewarnaan perak (*silver staining* dan *immunoblotting-photodetection*). Dalam satu tahun Fakultas Biologi menghasilkan 5-10 liter limbah perak. Limbah ini masih mengandung kadar perak AgNO₃ sebanyak 149,5 ppm. Kadar tersebut masih cukup tinggi untuk dimanfaatkan, namun tidak dapat digunakan kembali dalam proses pewarnaan. Pemanfaatan kembali limbah perak dapat dilakukan dengan mengubah partikel perak (Ag⁺) menjadi nanopartikel perak (AgNPs) melalui proses bioreduksi. Bioreduksi limbah perak dilakukan dengan penambahan eksopolisakarida yang dihasilkan oleh *Bacillus subtilis* (1:3) selama 52 hari. Nanopartikel perak yang dihasilkan dimonitoring dengan Spektrofotometer melalui pembentukan kurva plasmon resonans pada panjang gelombang 400-500 nm. Nanopartikel perak dari proses bioreduksi limbah tersebut mempunyai aktivitas antibakteri secara *in-vitro* (teknik *pour plate*) dapat menghambat bakteri *e-coli* FNCC55 dibandingkan dengan kontrol.

Kata Kunci : bioreduksi; eksopolisakarida; nanopartikel-perak; perak nitrat; *B. subtilis*

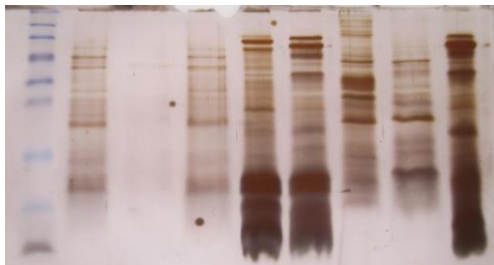
PENDAHULUAN

Fakultas Biologi UGM mempunyai 13 Laboratorium dan 1 Fasilitas Penelitian Bersama (FALITMA). Limbah laboratorium merupakan limbah buangan dengan volume paling besar yang ada di fakultas. Jenis limbah yang dihasilkan beragam baik limbah cair maupun padat, yaitu : limbah Bahan kimia Berbahaya dan Beracun (B3), limbah organik/non B3 dan limbah medik. Dari data internal fakultas Biologi tahun 2018, total limbah yang dihasilkan fakultas sebanyak 178,5 liter limbah medis, 357 liter limbah B3 dan 29 liter limbah organik/non-B3. Dalam upaya mengurangi limbah terutama limbah Bahan kimia Berbahaya dan Beracun (B3), fakultas melalui Fasilitas Penelitian Bersama (FALITMA) melakukan

pengolahan kembali limbah B3 hasil proses pewarnaan. Limbah B3 hasil proses pewarnaan dipilih karena merupakan campuran bahan murni sehingga mudah dipisahkan (diperoleh kembali) dan diolah menjadi bentuk lain untuk dimanfaatkan kembali. Salah satu limbah hasil pewarnaan yang diujicobakan adalah limbah perak AgNO₃ hasil proses pewarnaan *silver staining* (**Gambar 1**).

Limbah perak AgNO₃ yang dihasilkan dari proses pewarnaan ini merupakan limbah perak murni yang penyimpanannya dipisahkan dari limbah B3 yang lain. Dalam satu semester limbah perak yang dihasilkan laboratorium sebanyak 5 liter, sehingga fakultas harus membuang limbah B3 logam perak sebanyak 10 liter setiap tahun. Pada pengecekan konsentrasi,

limbah ini masih mengandung partikel perak (Ag^+) yang cukup tinggi (149,5 ppm) namun tidak dapat digunakan kembali dalam pewarnaan karena jumlah partikel peraknya kurang mencukupi (pewarnaan perak membutuhkan konsentrasi AgNO_3 sebanyak 1000 ppm). Pemanfaatan kembali limbah perak yang mungkin dilakukan adalah penggunaan kembali limbah perak melalui pengolahan menjadi bentuk lain. Salah satunya melalui proses bioreduksi menghasilkan nanopartikel perak.



Gambar 1. Pewarnaan silver staining (Bassam et al.)¹

Sintesis nanopartikel perak secara biologi menggunakan mikroorganisme dapat dilakukan secara ekstraseluler dan intraseluler. Sintesis nanopartikel perak secara intraseluler melibatkan enzim dan asam amino yang berasal dari suatu mikroorganisme sebagai agen pereduksi (*reducing agent*) untuk menghasilkan material berukuran nanometer, sedangkan secara ekstraseluler dilakukan dengan memisahkan suatu komponen sel yang selanjutnya hasil pemisahan tersebut yang digunakan sebagai agen pereduksi (*reducing agent*) seperti polimer hasil ekstraksi dari sel mikrobial (Junianto, 2017). Terkait dengan kegiatan penelitian laboratorium di fakultas Biologi UGM, pada tahun 2017 telah dilakukan penelitian mengenai biosintesis AgNO_3 menjadi nanopartikel-perak (AgNPS) dengan memanfaatkan proses bioreduksi dari

kultur bakteri *Bacillus subtilis* baik secara intraseluler (Sari, A.P., 2017) maupun secara ekstraseluler (Junianto, 2017). Sehingga, tujuan dari dilakukannya percobaan ini adalah untuk mengetahui apakah biosintesis nanopartikel perak dapat dilakukan menggunakan limbah AgNO_3 hasil proses pewarnaan perak *silver staining*.

Adapun metode yang dipilih adalah biosintesis secara ekstraseluler memanfaatkan eksopolisakarida *B. subtilis*. Pemilihan metode ini dengan mempertimbangkan kemanfaatan lebih lanjut hasil bioreduksi sebagai agen dekontaminasi permukaan dan kedekatan metode sintesis. Pada biosintesis secara ekstraseluler metode Junianto, 2017, digunakan larutan 1 mM AgNO_3 -PVA (setara dengan 166,67 ppm AgNO_3) mendekati konsentrasi akhir limbah hasil pewarnaan perak.

Potensi penggunaan kembali nanopartikel perak hasil pengolahan kembali limbah perak sebagai agen dekontaminasi permukaan dipilih karena sifat nanopartikel perak yang mampu menghambat bakteri patogen. Nanopartikel perak menghambat replikasi dengan mengikat mikrobial DNA dan juga menghentikan enzim-enzim penting yang berperan, sehingga memicu kematian sel bakteri. Faktanya, logam perak ini mempunyai spektrum yang luas terhadap bakteri Gram-positif maupun Gram-negatif (Refai et al., 2017). Sifat spektrum yang luas ini ideal untuk menggantikan agen dekontaminan komersial yang selama ini digunakan seperti Klorox maupun H_2O_2 2000 ppm yang bersifat korosif.

METODOLOGI

Pengujian ini dilakukan di unit Fasilitas Penelitian Bersama (FALITMA) fakultas Biologi UGM. Metode pewarnaan *silver staining* yang biasa kami gunakan

adalah metode Bassam et al., 1991³, sebanyak 1 g/l perak murni (AgNO_3) yang dicampurkan 1,5 ml/l formaldehid digunakan sebagai *developer* dalam proses pewarnaan. Setelah penggunaan, partikel perak Ag^+ pada limbah dianalisis kadarnya dengan titrasi pengendapan cara Mohr. Formaldehid pada limbah perak dinetralkan dengan penambahan Urea 8 N sebanyak 1,5 ml/l (1:1). Limbah AgNO_3 disimpan dalam botol kaca gelap bertutup untuk menghindari oksidasi oleh cahaya.

Alat dan Bahan

Alat yang kami gunakan pada percobaan ini adalah pH-meter (Metrohm), sentrifuge dingin (Hettich), inkubator (Mettler), *orbital shaker* (Stuart) spektrofotometer UV-Vis 10 Scanning (Thermo Scientific), *vortex* (Genie) timbangan analitik semi mikro (AND), autoklaf (Hirayama), alat gelas seperti erlenmeyer, buret, cawan petri dan tabung reaksi, serta bahan habis pakai seperti filter millipore 0,22 μm , mikrotube, pipet tip, konikal, dan sebagainya. Adapun bahan yang kami gunakan adalah medium basal (Yeast extract (Merck), CaCl_2 (Merck), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (Merck), KH_2PO_4 (Merck), K_2HPO_4 (Merck), $\text{MgSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (Merck), $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Merck), $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Merck), $\text{CoCl}_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Merck), $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (Merck), $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (Merck), dan Sukrosa (Merck)), AgNO_3 (Merck), PVA/Tetraethyl orthosilicate (Sigma), Ethanol absolut (Merck), NaCl (Merck), Mueller-Hinton Agar (Oxoid), *Tryptic Soy Broth* (Merck) dan Urea (Santacruz). Isolat kultur bakteri yang digunakan (*Bacillus subtilis* FNCC 0059 dan *Escherichia coli* FNCC 0055) dari koleksi laboratorium Mikrobiologi UGM.

Cara Kerja

1. Pengukuran Kadar AgNO_3 Limbah Perak

Sebanyak 5 ml limbah AgNO_3 dipipet kedalam erlenmeyer 25 ml, dititrasi menggunakan larutan standar NaCl 0,01 N. Titrasi dihentikan saat terbentuk endapan putih dan volume titran dicatat.

2. Penumbuhan Kultur *Bacillus subtilis*.

Dibuat medium basal sebanyak 1 liter dengan menimbang 0,5 gram yeast extract, 5,0 gram sukrosa, 5,2 gram K_2HPO_4 , 3,18 gram KH_2PO_4 , 0,6 gram $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,3 gram $\text{MgSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0,05 gram CaCl_2 , 0,0006 gram $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,0002 gram $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,0002 gram $\text{CoCl}_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,0002 gram $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, dan 0,0002 gram $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$. Kemudian pH larutan ditepatkan pada pH 5 sebagai pH optimum pembentukan eksopolisakarida *B. subtilis*. Isolat *Bacillus subtilis* FNCC 0059 diinokulasikan pada medium basal kemudian diinkubasi pada suhu ruang selama 24 jam dengan kecepatan agitasi 100 rpm.

3. Ekstraksi Eksopolisakarida

Kultur bakteri *B. subtilis* disentrifuge pada kecepatan 20.000 g selama 10 menit pada suhu 4°C. Kemudian diambil supernatan dan difilter dengan millipore 0,22 μm . Pada filtrat/supernatan ditambahkan ethanol absolut sebanyak 2x volume, campuran ini kemudian dipresipitasi pada suhu 4°C dan dibiarkan semalaman. Hasil eksopolisakarida yang telah mengendap kemudian dipisahkan dengan sentrifugasi pada kecepatan 12.000 rpm selama 10 menit pada suhu 4°C. Pellet kemudian dikeringkan dalam oven bersuhu 50°C, setelah kering kemudian dilarutkan dalam aquabidest steril sebanyak sepertiga volume filtrat/supernatan dan di-vortex.

4. Biosintesis Nanopartikel Perak.

Kedalam limbah AgNO_3 ditambahkan Urea 8 N sebanyak 1,5 ml/l untuk menetralkan formaldehid.

Kemudian ditambahkan *stabilizing agent* PVA 0,03 g/l sebanyak (1:100) volume limbah AgNO₃. Sebanyak 3 bagian volume limbah dicampurkan dengan 1 bagian volume suspensi larutan eksopolisakarida (EPS). Campuran ini kemudian dibiarkan selama 24 jam pada kondisi suhu ruang. Pembentukan nanopartikel perak diamati dengan spektrofotometer mode *scanning* pada panjang gelombang 300-700 nm. Pembentukan nanopartikel ditandai dengan perubahan warna larutan kecoklatan dan terbentuk kurva plasmon resonans pada daerah panjang gelombang 400-500 nm.

5. Uji Antimikrobia secara *in-vitro* (teknik *pour plate*).

Isolat bakteri patogen *Escherichia coli* FNCC 0055 diinokulasikan pada media TSP (*Tryptic Soy Broth*). Kemudian diinkubasi hingga OD suspensi bakteri menunjukkan serapan 0,096 pada panjang gelombang 600 nm dengan alat spektrofotometer, serapan ini setara dengan McFarland 0,5 (2x10⁸ CFU/ml). Sebanyak 50 µl suspensi bakteri dipipetkan kedalam cawan petri steril diikuti dengan penuangan medium Mueller Hinton Agar yang dipertahankan suhunya pada suhu 50°C agar tetap mencair selama proses penyiapan kultur (teknik *pour plate*).

Cawan petri kemudian digoyangkan searah jarum jam dan berlawanan arah jarum jam agar suspensi kultur homogen dengan medium padat. Setelah medium mengeras, dibagi dalam beberapa kuadran dan sebanyak masing-masing 2 ulangan *paperdisc* yang telah diimpregnasi dengan larutan nanopartikel perak ditempelkan pada permukaan medium agar. Medium agar kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C dan zona bening yang terbentuk diukur rerata diameternya dalam mm.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Biosintesis Nanopartikel Perak

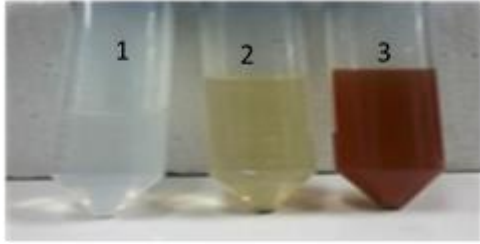
Pada proses pewarnaan perak (*silver staining*) metode Bassam et al., perak murni digunakan sebagai *developing agent* yang akan masuk kedalam pori-pori membran gel poliakrilamid dan berikatan dengan asam nukleat maupun protein yang sudah diimobilisasi pada membran. Kadar perak murni sebanyak 1000 ppm (1 g/l) akan berkurang drastis setelah digunakan sebagai larutan developer sebanyak 1 kali, hingga tersisa kadar perak murni sebanyak 149,5 ppm. Hasil Perhitungan kadar AgNO₃ pada limbah pewarnaan disajikan dalam **Tabel 1**.

Tabel 1. Analisis kadar perak murni pada limbah hasil pewarnaan perak (*silver staining*) metode Bassam et al., 1991.

No.	Volume titran (ml)	Rerata volume titran (ml)	Kadar AgNO ₃ dalam limbah (mg/L)	Kadar Acuan AgNO ₃ murni (mg/L)
1	2,28	2,20	149,49	166,67 (Junianto, 2017)
2	2,12			

Sebagai uji pendahuluan, titrasi metode Mohr dipilih karena dapat memberikan titik akhir titrasi yang masih dapat diamati meski tanpa penggunaan indikator K₂Cr₂O₇, meskipun dengan penggunaan indikator hasil yang diperoleh menjadi lebih sensitif karena terbentuknya endapan berwarna oranye

Ag₂(CrO₄). Dalam penetapan ini AgNO₃ diperlakukan sebagai sampel dibandingkan metode aslinya, langkah ini sering dilakukan untuk mengkalibrasi standar baku NaCl yang akan digunakan pada titrasi Mohr. Kadar dinyatakan dalam satuan g/l, g/100 ml (%) atau mol/l.

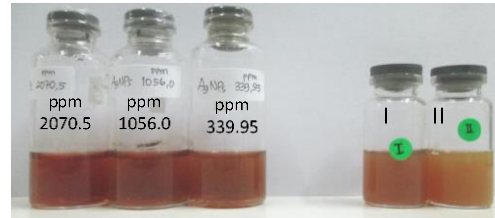


Gambar 2. Perubahan warna selama proses biosintesis nanopartikel perak; 1. AgNO₃-PVA, 2. Suspensi larutan eksopolisakarida (EPS) *Bacillus subtilis*, 3. AgNPs

Percobaan biosintesis limbah Ag⁺ menjadi nanopartikel perak ini mengacu pada penelitian tesis yang telah dilakukan oleh Junianto, 2017. Proses bioreduksi melibatkan polimer ekstraseluler berupa polisakarida yang dihasilkan oleh bakteri *B. subtilis*. Kultur *B. subtilis* dipilih karena mampu bertahan hidup pada medium yang diberi larutan Ag⁺ hingga konsentrasi 17 mg/l (Sari, A.P., 2017). Eksopolisakarida berperan sebagai matriks sekaligus sebagai agen pereduksi pada proses bioreduksi karena banyaknya kandungan gula pereduksi yang dihasilkan oleh kultur *B. subtilis* pada eksopolisakaridanya. Sehingga semakin banyak eksopolisakarida yang dihasilkan menjadi keuntungan bagi proses bioreduksi. pH optimum yang memberikan hasil produk eksopolisakarida yang maksimal adalah pada medium basal pH 5 (Junianto, 2017).

Selama proses biosintesis akan terjadi perubahan warna larutan dari tidak berwarna menjadi kecoklatan seiring dengan banyaknya nanopartikel yang terbentuk. Perubahan warna ini dapat diamati pada **Gambar 3**. Dibandingkan dengan penggunaan AgNO₃ murni, hasil nanopartikel perak yang terbentuk dari limbah AgNO₃ tidak menunjukkan perbedaan warna yang signifikan. Perbandingan ini dapat

diamati pada **Gambar 4**. Dari gambar tersebut dapat diamati nanopartikel perak dari AgNO₃ murni (166,67 mg/l) berumur lebih dari 52 hari berwarna kecoklatan yang lebih pekat tanda bioproses pembentukan telah selesai dan hasil nanopartikel perak yang terbentuk stabil dibandingkan dengan nanopartikel perak dari limbah AgNO₃ (149,5 mg/l) yang baru berumur selama 2 minggu. Perbedaan hasil nanopartikel perak yang terbentuk dari AgNO₃ murni dan limbah AgNO₃ kemudian diamati lebih lanjut melalui pembacaan pada alat.



Gambar 2. Perbandingan hasil biosintesis AgNPs menggunakan AgNO₃ murni dan AgNO₃ limbah (kiri; AgNPs perak murni, kanan; AgNPs limbah perak)

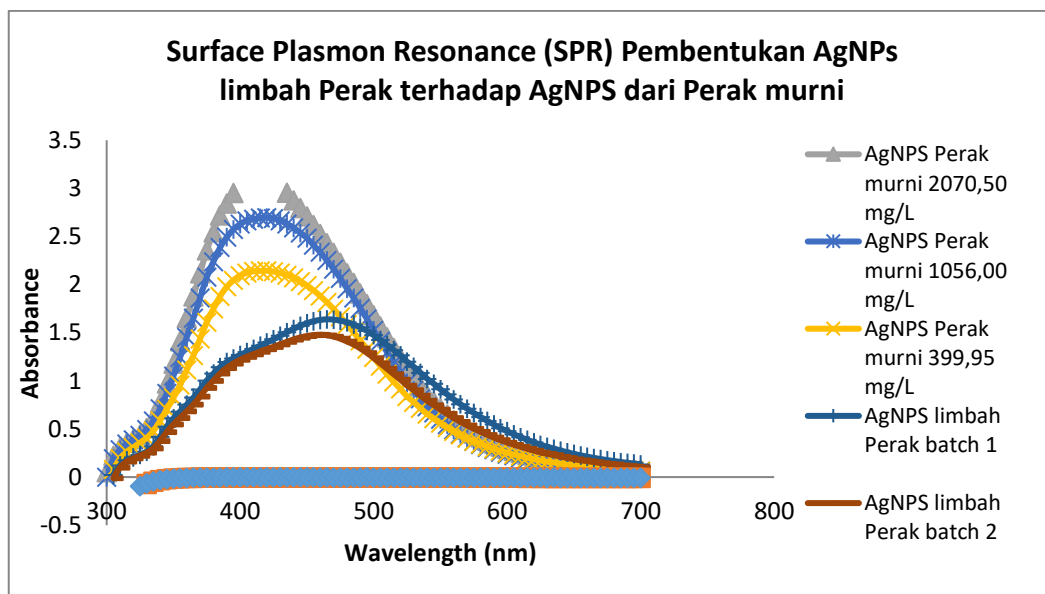
Karakteristik Nanopartikel Perak

Pengamatan pembentukan nanopartikel perak dilakukan menggunakan spektrofotometer UV-Vis *scanning* melalui pembentukan kurva plasmon resonans (*surface plasmon resonance* (SPR)) yang spesifik untuk nanopartikel perak diantara panjang gelombang 400-500 nm. Pada panjang gelombang tersebut, larutan AgNO₃ murni maupun limbah tidak menunjukkan adanya serapan, seperti pada nanopartikel perak (AgNPs). Hasil pengukuran ditunjukkan pada **Gambar 5**.

Surface plasmon resonance (SPR) yang diamati pada perubahan partikel perak (Ag⁺) menjadi nanopartikel perak (Ag⁰) merupakan bentuk pergeseran Hiperkromik karena perubahan efek struktur intramolekul

yang disebabkan oleh stabilisasi bentuk Ag^0 dengan pelepasan satu molekul proton (+) (Koleva, 2009). Delokalisasi Ag^0 menghasilkan energi resonansi yang terbaca dalam bentuk serapan atom. Karena serapan pada panjang gelombang 400-500 nm ini spesifik untuk Ag^0 , maka perubahan $Ag^+ \rightarrow Ag^0$ dapat dengan mudah diamati dan menjadi kontrol bagi pembentukan nanopartikel perak.

Selain pengamatan melalui alat spektrofotometer, dilakukan juga pengamatan aktivitas nanopartikel perak hasil bioreduksi limbah $AgNO_3$ melalui uji antibakteri pathogen secara *in-vitro*. Bakteri pathogen yang digunakan adalah *E.coli* FNCC 0055 yang merupakan bakteri Gram negatif. Hasil aktivitas antibakteri dapat diamati pada **Tabel 2** dan **Gambar 6**.



Gambar 3. Kurva Surface Plasmon Resonans (SPR) AgNPs dan $AgNO_3$ pada pembacaan scanning dengan Spektrofotometer

Tabel 2. Hasil pengukuran zona bening pada uji aktivitas antibakteri terhadap *Eschericia coli* FNCC0055

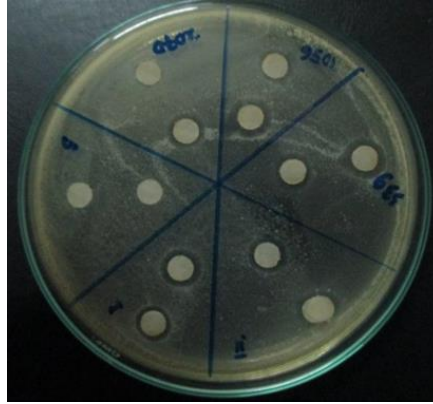
Kode/ konsentrasi	Rerata mm zona bening
Blank (B)	0
I	4
II	2
AgNPs 339	3,5
AgNPs 1056	3,5
AgNPs 2070	2

Hasil pengamatan aktivitas antibakteri pada sampel dan kontrol tidak mengalami perbedaan yang signifikan. Sampel (nanopartikel perak

dari limbah $AgNO_3$) terbukti dapat memberikan penghambatan terhadap bakteri pathogen dan mempunyai aktivitas antibakteri serupa dengan kontrol positif (nanopartikel perak dari $AgNO_3$ murni). Blanko (B) tidak memberikan aktivitas antibakteri.

Metode pengujian agar *disc-diffusion method* sebagai metode *in-vitro* ini dipilih karena mampu memberikan hasil kualitatif yang relatif cepat, mudah diinterpretasikan, mudah dilakukan, murah dan dapat diaplikasikan pada berbagai jenis mikroorganisme dan agen antimikrobia (Baluoiri et al., 2016).

$$\text{Zona Hambat} = \{(\text{diameter vertikal} + \text{diameter horizontal}) / 2\} - \text{diameter paperdisc}$$



Gambar 4. Pengukuran zona bening penghambatan mikrobial sampel dan kontrol (Blank sebagai kontrol negatif, AgNPs 339, 1056, 2070 sebagai kontrol positif, I & II adalah sampel) terhadap *E-coli* FNCC55

KESIMPULAN

Proses biosintesis nanopartikel perak dapat dilakukan menggunakan sumber AgNO_3 yang berasal dari limbah pewarnaan perak. Limbah yang digunakan adalah limbah murni, tidak dicampur dengan limbah Bahan Berbahaya dan Beracun (B3) yang lainnya dan disimpan dalam botol gelap.

Hasil proses bioreduksi limbah perak AgNO_3 mempunyai karakteristik nanopartikel perak yang khas dengan *Surface Plasmon Resonance* (SPR) panjang gelombang 400-500 nm seperti pada nanopartikel perak murni.

Nanopartikel perak dari limbah pewarnaan dapat memberikan penghambatan zona bening pada bakteri patogen sebesar rerata 3 mm, hasil ini setara bila dibandingkan dengan kontrol nanopartikel perak murni.

UCAPAN TERIMAKASIH

Laboratorium Struktur dan Perkembangan Hewan, Laboratorium Mikrobiologi, dan Fasilitas Penelitian Bersama (FALITMA) Fakultas Biologi UGM.

DAFTAR PUSTAKA

- Balouiri, M., Sadiki, M., Ibensouda, S.K., 2016. Methods for *in-vitro* Evaluating Antimicrobial Activity : A Review. *Journal of Pharmaceutical Analysis*. 6 : 71-79
- Bassam, Brant J., Caetano-Anolles, Gustavo, Gresshoff, Peter M. 1991. Fast and Sensitive Silver Staining of DNA in Polyacrylamide Gels. *Analytical Biochemistry*. 196 : 80-83.
2018. Internet : University of Canterbury. Determination of Chloride Ion Concentration by Titration (Mohr's Method). 15 Mei 2018. https://www.canterbury.ac.nz/media/documents/science-outreach/chloride_mohr.pdf
- Junianto, Dwi. 2017. Sintesis Nanopartikel Perak Menggunakan Biomatriks Ekspolisakarida *Bacillus subtilis*. Thesis. Program Studi S2 Fakultas Biologi UGM: Yogyakarta.
- Koleva, B., 2009. Spectroscopic Elucidation of Functional Dyes. *Asian Chemistry Letters*. 13 : 125-134.

- Rifai, H., Badawy, M., Hassan, A., Sakr, H., Baraka, Y., 2017. Antimicrobial Effect of Biologically Prepared Silver Nanoparticles (AgNPs) on Two Different Obturator's Soft Linings in Maxillectomy Patients. *European Journal of Academic Essays*. 4 : 15-25.
- Sari, Afrizka Premana. 2017. Biosintesis Nanopartikel Perak oleh Bakteri Limbah Industri Perak dan Aktivitas Antifungsinya. Thesis. Program Studi S2 Fakultas Biologi UGM: Yogyakarta.