

ARTIKEL PENELITIAN

The Potential of *Bacillus* spp. in Green Biosynthesis of Zinc Oxide Nanoparticles

Lola Alvice¹, Anthoni Agustien², Akmal Djamaan^{3*}

1. *Biotechnology Department, Post Graduates Programe, Universitas Andalas, Padang-West Sumatra, Indonesia*; 2. *Biology Department, Faculty of Sciences, Universitas Andalas, Padang- West Sumatra, Indonesia*; 3. *Faculty of Pharmacy, Universitas Andalas, Padang-West Sumatra, Indonesia*

Korespondensi: Akmal Djamaan; Email: akmaldjamaan@phar.unand.ac.id

Abstrak

Tujuan: Nanopartikel yang dihasilkan melalui metode Green biosintesis berpotensi untuk diterapkan pada dunia medis dan farmasi. **Metode:** Penelitian ini menggunakan senyawa metabolit yang dihasilkan isolat *Bacillus* spp untuk mereduksi zink sulfat menjadi nanopartikel zink oksida. **Hasil:** Berdasarkan hasil pengukuran spektrofotometri UV-Vis panjang gelombang optimum koloid nanopartikel yang dihasilkan dari proses Green biosintesis isolate BES 6A dengan penambahan zink sulfat sebanyak 0,2 g/ml yaitu pada 366 nm. Adapun gugus fungsi Zn-O berdasarkan pengukuran FTIR terbaca pada panjang puncak gelombang 438 dan 530 cm^{-1} . **Kesimpulan:** Bentuk kristal yang dihasilkan yaitu heksagonal dengan puncak 2θ yang terdeteksi yaitu 31,82°; 34,33°; 36,49°; 47,56°; 57,16°; 63,20°; 66,76°; dan 68,99° yang menandakan kehadiran nanopartikel zink oksida berdasarkan referensi ICDD 00-001-1136. Ukuran nanopartikel yang dihasilkan yaitu 30 – 47 nm.

Kata kunci: Green Nanopartikel; Reduksi nano; Bioteknologi nano

Abstract

Objective: Nanoparticles produced through the green biosynthesis method have the potential to be applied in the medical and pharmaceutical fields. **Methods:** This study used metabolites produced by *Bacillus* spp. isolates to reduced zinc sulfate into zinc oxide nanoparticles. **Results:** Based on the UV-Vis spectrophotometry measurements, the optimum wavelength of colloidal nanoparticles produced from the green biosynthesis process of BES 6A isolate with the addition of 0.2 g/ml zinc sulfate was 366 nm. The Zn-O functional group based on FTIR measurements was observed at peak wavelengths of 438 and 530 cm^{-1} . **Conclusion:** The resulting crystal shape was hexagonal with a peak of 2θ detected, namely 31.82°; 34.33°; 36.49°; 47.56°; 57.16°; 63.20°; 66.76°; and 68.99° which indicated the presence of zinc oxide nanoparticles based on ICDD 00-001-1136 reference. The size of the nanoparticles produced was 30-47 nm.

Keywords: Green Nanoparticles; Nano reduction; Nano - biotechnology

PENDAHULUAN

Penerapan teknologi yang terjadi secara massif saat ini memicu pergerakan dunia penelitian semakin cepat dan tepat sasaran. Salah satu bidang teknologi yang terus berkembang dan diteliti yaitu nanopartikel. Polimer biodegradasi yang terdapat pada partikel ini mengandung agen aktif yang dapat diaplikasikan secara luas terutama pada bidang medis. Nanopartikel zink oksida berpotensi untuk diterapkan pada bidang medis yaitu sebagai anti-oksidan, agen anti-diabetes, anti-mikroba, agen penyembuh luka, dan anti-inflamasi^{1,2}. Selain itu nanopartikel juga dapat digunakan sebagai “*molecular imaging*” sehingga resolusi gambar yang diperoleh lebih baik terutama pada proses diagnostik molekuler³. Berdasarkan keunggulan tersebut teknologi nano sangat layak dikaji agar dapat diterapkan lebih luas dalam aspek kedokteran dan farmasi.

Nanopartikel dapat diperoleh dengan menggunakan teknik *top-down* secara fisika maupun *bottom-up* secara kimia dan biologis⁴. Metode sintesis nanopartikel secara fisika dan kimia melibatkan bahan kimia yang berbahaya, energi produksi yang besar, dan tidak ramah lingkungan. Hal tersebut menyebabkan metode biologis atau lebih dikenal sebagai green sintesis menjadi lebih populer. Green sintesis menghasilkan partikel dalam skala nano dengan melibatkan mikroorganisme maupun ekstrak tanaman sebagai bioreduktor⁵. Disisi lain metode ini juga dikategorikan kedalam bidang nanobioteknologi sehingga dapat meningkatkan penemuan organisme baru sebagai bioreduktor untuk proses sintesis nanopartikel. Keunggulan metode ini yaitu lebih hemat secara biaya maupun energi

produksi, toksisitas rendah, dan ramah lingkungan.

Metode green sintesis yang digunakan untuk memproduksi nanopartikel dapat dilakukan secara intraseluler maupun ekstraseluler. Pada green sintesis intraseluler, pellet bakteri akan digunakan untuk mensintesis nanopartikel. Senyawa yang berperan pada proses sintesis tersebut yaitu polisakarida dan protein yang terdapat pada dinding sel bakteri. Hal ini menyebabkan tidak semua bakteri dapat berpotensi untuk mensintesis nanopartikel logam maupun logam oksida.

Pada green sintesis ekstraseluler, larutan supernatan memiliki peran penting dalam proses sintesis. Hal ini dikarenakan pada larutan tersebut kaya akan kandungan komponen aktif biologis yang dihasilkan oleh bakteri. Adapun senyawa yang terlibat meliputi enzim, protein, dan metabolit yang dihasilkan oleh mikroba tersebut⁵. Selain itu pada larutan supernatan terdapat enzim NADPH reduktase yang menyebabkan reaksi reduktasi dengan mentransfer elektron kepada ion zink agar membentuk nanopartikel⁶. Berdasarkan hal tersebut green sintesis ekstraseluler lebih menguntungkan untuk diterapkan dalam skala industri karena dapat menghasilkan produk hasil sintesis dalam skala besar dan metode pemurnian produk hasil lebih sederhana.

Nanopartikel Zink Oksida merupakan senyawa logam oksida seng yang memiliki skala ukuran nano yaitu 1 – 100 nm. Logam oksida ini bersifat paling stabil pada berbagai kondisi lingkungan manapun dan dapat disintesis pada temperatur yang rendah⁷. Balraj *et al.* (2016) berhasil mengembangkan metode green sintesis nanopartikel dengan ukuran diameter 20 – 50 nm menggunakan bioreduktor *Streptomyces* sp. secara ekstraseluler⁸.

Selain itu Saravanan *et al.* (2018) juga melakukan biosintesis ekstraseluler dengan menggunakan supernatan dari inokulum *B. megaterium*. Nanopartikel yang diperoleh dari penelitian tersebut memiliki diameter 45 – 95 nm⁹.

Pada penelitian ini partikel nano Zink Oksida akan diproduksi menggunakan metode green sintesis dengan bantuan isolat bakteri endofit koleksi Laboratorium Bioteknologi Biota Sumatera Universitas Andalas sebagai bioreduktor. Isolat bakteri yang akan digunakan yaitu bakteri yang berasal dari daun surian. Penelitian yang dilakukan Sarina *et al.*, (2020) menunjukkan bahwa isolat bakteri surian berpotensi sebagai bioreduktor sintesis nanopartikel perak (Ag) secara ekstraseluler dengan serapan optimum berkisar pada 405 – 434 nm¹⁰

METODE

Bahan yang digunakan adalah bakteri koleksi BES sebanyak 8 isolat pada Laboratorium Bioteknologi Biota Sumatera Universitas Andalas, Nutrient Broth (Merck®), Zinc sulfat (Merck®), primer spesifik *Bacillus spp.* BacF (5'- CAT AAG ACT GGG ATA ACT CCG GG -3') dan BacR (5'- CCA GGC GGA GTG CTT AAT GC-3'), Go Taq® Green Master Mix 2x (Promega), *nuclease free water*, *DNA ladder*, gel agarose, buffer TBE 0,5x.

Ekstraksi senyawa metabolit isolate *Bacillus spp.*

Bakteri yang digunakan *Bacillus spp.* sebanyak 8 isolat yaitu BES 01, BES 02, BES 03, BES 05, BES 6A, BES 6B, BES 7A, dan BES 08. Bakteri disub-kultur ke media NB dan dishaker 250 rpm pada suhu 37°C selama 24 jam. Kultur bakteri yang ada pada media NB disentrifugasi pada 6000 rpm selama 30 menit. Selanjutnya disaring menggunakan

filter syringe 0,2 µm untuk mengumpulkan supernatant dan dimasukkan pada Erlenmeyer steril.

Skrining bakteri bioreduktor nanopartikel Zink Oksida

Larutan prekursor zinc sulfat konsentrasi 0.1 g/mL dicampurkan dengan 15 ml supernatant setiap kultur isolat bakteri koleksi dalam labu Erlenmeyer 50 mL. Seluruh sampel di shaker pada kecepatan 150 rpm pada suhu 37°C dan selama 7 hari. Perubahan warna larutan dari bening menjadi putih keruh mengindikasikan terbentuknya nanopartikel Zink Oksida dan dikonfirmasi dengan spektrofotometri UV-Vis dalam kuvet kuarsa dengan menggunakan aquadest sebagai pelarut referensi. Spectrum serapan pada area panjang gelombang 340 - 373 nm mengindikasikan terbentuknya nanopartikel Zink Oksida.

Biosintesis nanopartikel Zink Oksida

Volume supernatan bakteri yang ditambahkan dan durasi sintesis optimum ditentukan untuk sintesis nanopartikel Zink Oksida. Prekursosr zinc sulfat yang dimasukkan bervariasi yaitu 0.05; 0.1; 0.15; 0.2; 0.25 g/mL dimasukkan kedalam Erlenmeyer ukuran 50 mL yang berisi 15 mL supernatan. Sintesis dilakukan selama 1 minggu dan pembentuknan nanopartikel Zink Oksida. Parameter analisis spektrofotometri UV-Vis seperti yang dijelaskan sebelumnya.

Karakterisasi panjang gelombang nanopartikel Zink Oksida dengan Spektrofotometer UV-Vis

Panjang gelombang koloid nanopartikel zink oksida yang terbentuk diukur menggunakan Spektrofotometer UV-Vis (Thermo Scientific™ Genesys 150 UV-Vis).

Bahan yang digunakan adalah bakteri koleksi BES sebanyak 8 isolat pada Laboratorium Bioteknologi Biota Sumatera Universitas Andalas, Nutrient Broth (Merck®), Zinc sulfat (Merck®), primer spesifik *Bacillus spp.* BacF (5'-CAT AAG ACT GGG ATA ACT CCG GG -3') dan BacR (5'-CCA GGC GGA GTG CTT AAT GC-3'), Go Taq® Green Master Mix 2x (Promega), *nuclease free water*, *DNA ladder*, gel agarose, buffer TBE 0,5x.

Ekstraksi senyawa metabolit isolate *Bacillus spp.*

Bakteri yang digunakan *Bacillus spp.* sebanyak 8 isolat yaitu BES 01, BES 02, BES 03, BES 05, BES 6A, BES 6B, BES 7A, dan BES 08. Bakteri disub-kultur ke media NB dan dishaker 250 rpm pada suhu 37°C selama 24 jam. Kultur bakteri yang ada pada media NB disentrifugasi pada 6000 rpm selama 30 menit. Selanjutnya disaring menggunakan filter syringe 0,2 µm untuk mengumpulkan supernatant dan dimasukkan pada Erlenmeyer steril.

Skrining bakteri bio reduktor nanopartikel Zink Oksida

Larutan prekursor zinc sulfat konsentrasi 0.1 g/mL dicampurkan dengan 15 ml supernatant setiap kultur isolat bakteri koleksi dalam labu Erlenmeyer 50 mL. Seluruh sampel di shaker pada kecepatan 150 rpm pada suhu 37°C dan selama 7 hari. Perubahan warna larutan dari bening menjadi putih keruh mengindikasikan terbentuknya nanopartikel Zink Oksida dan dikonfirmasi dengan spektrofotometri UV-Vis dalam kuvet kuarsa dengan menggunakan aquadest sebagai pelarut referensi. Spectrum serapan pada area panjang gelombang 340 - 373 nm mengindikasikan terbentuknya nanopartikel Zink Oksida.

Biosintesis nanopartikel Zink Oksida

Volume supernatan bakteri yang ditambahkan dan durasi sintesis optimum ditentukan untuk sintesis nanopartikel Zink Oksida. Prekursor zinc sulfat yang dimasukkan bervariasi yaitu 0.05; 0.1; 0.15; 0.2; 0.25 g/mL dimasukkan kedalam Erlenmeyer ukuran 50 mL yang berisi 15 mL supernatan. Sintesis dilakukan selama 1 minggu dan pembentuk nanopartikel Zink Oksida. Parameter analisis spektrofotometri UV-Vis seperti yang dijelaskan sebelumnya.

Karakterisasi panjang gelombang nanopartikel Zink Oksida dengan Spektrofotometer UV-Vis

Panjang gelombang koloid nanopartikel zink oksida yang terbentuk diukur menggunakan Spektrofotometer UV-Vis (Thermo Scientific™ Genesys 150 UV-Vis). Larutan dimasukkan sebanyak 2 ml kedalam kuvet kaca. Bagian bening kuvet diarahkan ke tempat penembakan cahaya, kemudian dilakukan pengukuran secara otomatis.

Karakterisasi gugus fungsi nanopartikel Zink Oksida dengan FTIR

Larutan nanopartikel Zink Oksida disentrifugasi pada 20.000 rpm selama 30 menit untuk menghilangkan biomasa bebas yang bukan merupakan ligan capping dari nanopartikel. Setelah disentrifugasi, nanopartikel yang mengendap pada bagian bawah dikumpulkan dan dicuci dengan aquades. Selanjutnya sampel dikeringkan dalam oven pada suhu 80°C selama 20 menit. Karakterisasi gugus fungsi menggunakan *fourier transform infrared* (FTIR) metode cakram KBr untuk mengetahui gugus fungsi yang terbentuk setelah biosintesis. Sebanyak 1 mg sampel didispersikan dengan 100 mg KBr, selanjutnya ditempa

menjadi pellet menggunakan tekanan tinggi. Spectrum serapan direkam pada bilangan gelombang 4000-400 cm^{-1} .

Karakterisasi bentuk struktur kristal nanopartikel Zink Oksida dengan XRD

Rendemen yang telah mengering kemudian di furnace pada suhu 700°C selama 5 jam. Bubuk stabil dari nanopartikel disimpan untuk proses karakterisasi. Karakterisasi bentuk struktur kristal dilakukan pada sampel dalam bentuk rendemen dan bubuk yang telah difurnace. Bentuk struktur kristal nanopartikel yang terbentuk dikarakterisasi menggunakan *X-ray powder diffraction* (XRD). Alat yang digunakan yaitu difraktometer sinar-X pada rentang 2θ 10-50°. Sebanyak 10 mg sampel ditempatkan pada kaca sampel holder kemudian diratakan. Sampel dapat diukur pada suhu ruang dengan beberapa syarat kondisi meliputi: target logam Cu, filter $K\alpha$, voltase 40kV, arus 30 mA, rentang analisis 2θ 10-90°.

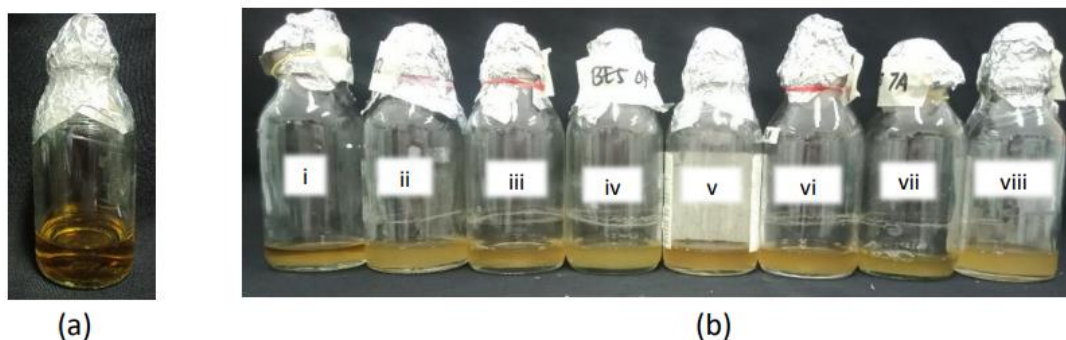
Karakterisasi ukuran partikel Zink Oksida dengan PSA

Koloid nanopartikel zink oksida diukur menggunakan alat Delsa Nano Particle Size Analyser yang telah terhubung ke computer sehingga dapat ditentukan distribusi suspensi partikel. Indeks refraksi dan viskositas koloid ditentukan terlebih dahulu kemudian sampel dimasukkan kedalam kuvet PSA.

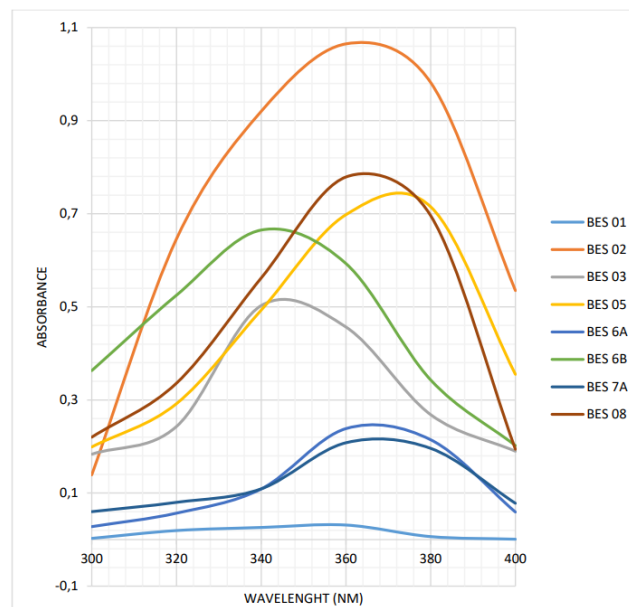
HASIL DAN PEMBAHASAN

Skrining bakteri bio reduktor nanopartikel Zink Oksida

Skrining biosintesis dilakukan untuk mengetahui kemampuan isolat BES untuk menghasilkan nanopartikel zink oksida. Terdapat beberapa indikator yang menandakan terbentuknya nanopartikel zink oksida yaitu: adanya endapan putih yang terbentuk pada permukaan tabung¹¹, perubahan warna larutan dari bening hingga menjadi keruh¹², serta serapan pada rentang panjang gelombang 340 – 373 nm menggunakan spektrofotometer UV-Vis¹³.



Gambar 1. Perubahan warna sebelum (a) yaitu larutan supernatan dan setelah (b) yaitu menunjukkan terbentuknya koloid nanopartikel zink oksida dengan bio reduktor: (i) BES 01, (ii) BES 02, (iii) BES 03, (iv) BES 05, (v) BES 6A, (vi) BES 6B, (vii) BES 7A, (viii) BES 08



Gambar 2. Profil hasil penentuan panjang gelombang maksimal dari supernatan isolat bioreduktor BES 01, BES 02, BES 03, BES 05, BES 6A, BES 6B, BES 7A, dan BES 08 yang mengandung nanopartikel zink oksida pada hari ke tujuh sintesis dimana x: panjang gelombang (nm) dan y: nilai absorbansi

Tabel 1. Hasil pengukuran panjang gelombang (nm) maksimum dari larutan supernatan isolat BES yang mengandung nanopartikel zink oksida

Kode Isolat bakteri	$\lambda_{maks.}$ (nm)	Absorbansi
BES 01	359	0.032
BES 02	360	1.065
BES 03	344	0.504
BES 05	370	0.717
BES 6A	357	0.239
BES 6B	346	0.665
BES 7A	370	0.208
BES 08	363	0.779

Nilai absorbansi menunjukkan kerapatan partikel didalam larutan sehingga dapat menghambat pantulan cahaya UV yang ditembakkan oleh alat spektrofotometer UV-Vis. Berdasarkan hal tersebut semakin keruh larutan yang terbentuk berbanding lurus dengan meningkatnya nilai absorbansi spektrum UV-Vis. Bakteri BES 02 menunjukkan nilai absorbansi paling tinggi pada panjang gelombang 360 nm senilai 1,065. Biosintesis nanopartikel yang dilakukan

oleh Miri *et al.* (2019) juga menunjukkan spektrum UV-Vis pada panjang gelombang yang serupa yaitu 362 nm¹⁴. Puncak yang terbentuk pada spektrum UV-Vis disebabkan adanya transfer elektron dari valensi terhadap pita konduksi pada celah pita utama zink oksida, O2p terhadap Zn3d¹⁵. Adapun nilai absorbansi paling rendah yaitu dimiliki oleh isolat BES 01 pada panjang gelombang 359 nm senilai 0,032.

Zink merupakan elemen aktif dan memiliki sifat reduksi yang kuat sehingga lebih mudah teroksidasi membentuk zink oksida. Mekanisme biosintesis nanopartikel zink oksida dibantu oleh adanya potensial elektro kinetik negatif pada sel bakteri sehingga dapat menarik kation logam¹⁶. Hal ini menyebabkan terjadinya konversi kimia oleh protein dan karbohidrat yang dihasilkan isolat bioreduktor pada larutan supernatan. Selain itu hal tersebut juga dipengaruhi oleh keberadaan gugus fungsi pada senyawa bioaktif (gugus amino, sulfat, karboksil, dan hidroksil) yang dihasilkan baik intraseluler maupun ekstraseluler oleh isolate bakteri¹³. Senyawa tersebut menyebabkan terjadinya proses biotransformasi. Oleh karena itu metode green sintesis dapat bertindak sebagai pereduksi sekaligus menstabilkan nanopartikel yang terbentuk.

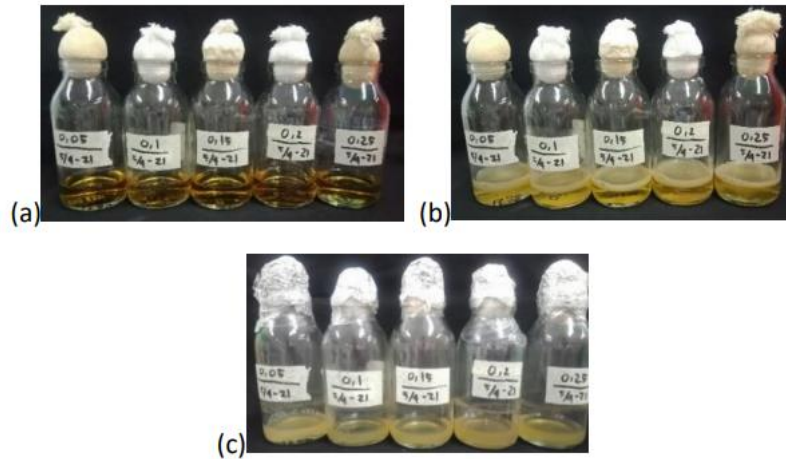
Pada green biosintesis ekstraseluler, larutan supernatan sangat berperan penting dalam proses sintesis. Senyawa yang berperan penting yaitu berupa enzim, protein, dan metabolit yang dihasilkan oleh mikroba tersebut⁵. Selain itu pada larutan supernatan terdapat enzim NADPH reduktase yang menyebabkan reaksi reduktasi dengan mentransfer elektron kepada ion zinc agar membentuk nanopartikel⁶. Berdasarkan hal tersebut green sintesis ekstraseluler lebih menguntungkan untuk diterapkan dalam skala industri karena dapat menghasilkan produk hasil sintesis dalam skala besar dan metode pemurnian produk hasil lebih sederhana.

Metode green biosintesis nanopartikel Zink Oksida secara ekstraseluler berhasil ditemukan oleh Kundu *et al.* (2014) dengan menggunakan larutan supernatant isolat *Rhodococcus pyridinivorans* NT2. Perubahan warna yang terjadi yaitu

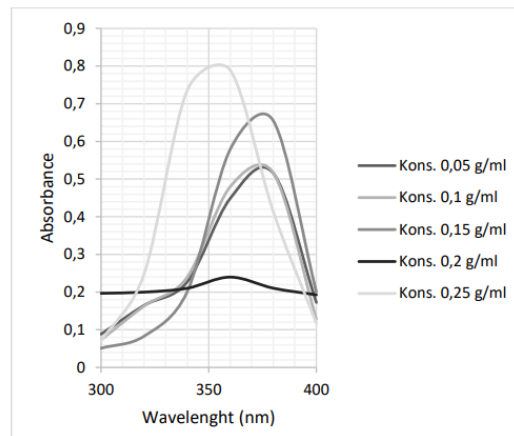
larutan bening menjadi bewarna putih keruh. Adapun grup fungsional yang terlibat yaitu amino, sulfat, karboksil, dan hidroksil. Balraj *et al.* (2016) juga berhasil mengembangkan metode green biosintesis nanopartikel Zink Oksida secara ekstraseluler dengan ukuran diameter 20 – 50 nm menggunakan bioreduktor *Streptomyces* sp. Larutan supernatant optimum yang digunakan untuk memperoleh nanopartikel Zink Oksida yaitu sebanyak 1,5 mL. Selama proses sintesis terjadi perubahan warna dari hijau gelap menjadi putih susu yang mengindikasikan pembentukan nanopartikel Zink Oksida. Adapun pada penelitian yang dilakukan oleh Saravanan *et al.* (2018) juga melakukan biosintesis ekstraseluler dengan menggunakan supernatan dari inokulum *B. megaterium* sebanyak 100 mL. Nanopartikel yang diperoleh dari penelitian tersebut memiliki diameter 45 – 95 nm dan ditandai dengan adanya endapan putih pada bagian permukaan tabung Erlenmeyer.

Enzim nitrat reductase akan mengkatalisis reaksi perombakan nitrat menjadi nitrit. Bioreduksi ion Zn^{2+} diinisiasi oleh adanya transfer electron dari NADH yang dibantu oleh enzim NADH-reduktase, berperan sebagai pembawa electron. Elektron yang diperoleh ion Zn^{2+} akan bereduksi menjadi muatan nol¹⁷. Penelitian yang dilakukan oleh¹³ membuktikan keberadaan enzim NADH-reduktase dengan berat molekul 43 kDa pada pengujian SDS-PAGE larutan supernatan inokulum bakteri *Rhodococcus pyridinivorans* NT2. Akan tetapi proses biosintesis yang bersifat enzimatik ini dapat dipengaruhi oleh adanya pemanasan selama proses sintesis sehingga dapat mempengaruhi mutu partikel nano yang terbentuk¹⁸.

Pengaruh konsentrasi precursor terhadap biosintesis nanopartikel



Gambar 3. Perubahan warna pada proses Green biosintesis nanopartikel zink oksida menggunakan isolat BES 6A. Keterangan: (a) sebelum sintesis yaitu larutan supernatan bakteri; (b) sesaat ditambahkan prekursor ZnSO₄ (i) 0,05 g/ml; (ii) 0,1 g/ml; (iii) 0,15 g/ml; (iv) 0,2 g/ml; (v) 0,25 g/ml pada larutan supernatan yaitu pada saat 0 jam; dan (c) setelah mengalami biosintesis selama 7 hari yaitu koloid nanopartikel zink oksida yang terbentuk



Gambar 4. Profil hasil penentuan panjang gelombang maksimal dari supernatan isolat bioreduktor BES 6A yang mengandung nanopartikel zink oksida pada hari ke tujuh sintesis dengan variasi konsentrasi prekursor ZnSO₄ (a) 0.05 g/ml, (b) 0.1 g/ml, (c) 0.15 g/ml, (d) 0.2 g/ml, dan (e) 0.25 g/ml; dimana x: panjang gelombang (nm) dan y: nilai absorbansi

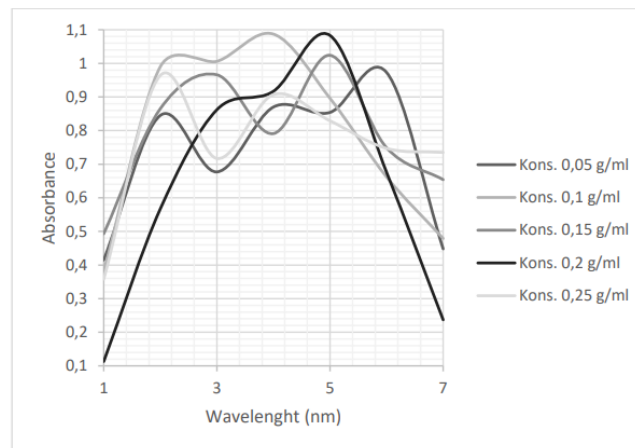
Tabel 2. Hasil pengukuran panjang gelombang (nm) maksimum dari larutan supernatan isolat bioreduktor 6A dengan variasi konsentrasi precursor ZnSO₄ yang menunjukkan terbentuknya nanopartikel zink oksida

Konsentrasi ZnSO ₄ (g/ml)	λmaks. (nm)	Absorbansi
0,05	370	0.448
0,1	370	0.479
0,15	360	0.654
0,2	366	0.237
0,25	352	0.735

Penambahan prekursor $ZnSO_4$ menyebabkan perubahan warna pada larutan supernatan isolat BES 6A dari coklat muda bening menjadi kuning keemasan bening dengan endapan pada bagian permukaan larutan. Konsentrasi prekursor $ZnSO_4$ 0,2 g/ml menunjukkan nilai absorbansi paling rendah yaitu 0,237 pada panjang gelombang optimum 366 nm.

Biosintesis nanopartikel yang dilakukan oleh S. Rehman *et al.* (2019) juga Pengaruh lama waktu inkubasi terhadap biosintesis nanopartikel Zink Oksida

menunjukkan serapan pada panjang gelombang yang serupa yaitu pada 354 nm. Peningkatan konsentrasi prekursor yang ditambahkan pada larutan supernatan isolat BES 6A dapat meningkatkan nilai absorbansi koloid nanopartikel yang terbentuk. Akan tetapi pada konsentrasi 0,2 g/ml terjadi penurunan nilai absorbansi menjadi 0,237 dan merupakan nilai paling rendah.



Gambar 1. Profil hasil penentuan panjang gelombang maksimal dari supernatan isolat bioreduktor BES 6A yang mengandung nanopartikel zink oksida selama tujuh hari sintesis dengan variasi konsentrasi prekursor $ZnSO_4$ (a) 0.05 g/ml, (b) 0.1 g/ml, (c) 0.15 g/ml, (d) 0.2 g/ml, dan (e) 0.25 g/ml; dimana x: panjang gelombang (nm) dan y: nilai absorbansi

Tabel 2. Hasil penentuan serapan absorbansi maksimal dari supernatan isolat bioreduktor BES 6A yang mengandung nanopartikel zink oksida selama tujuh hari sintesis dengan variasi konsentrasi prekursor $ZnSO_4$

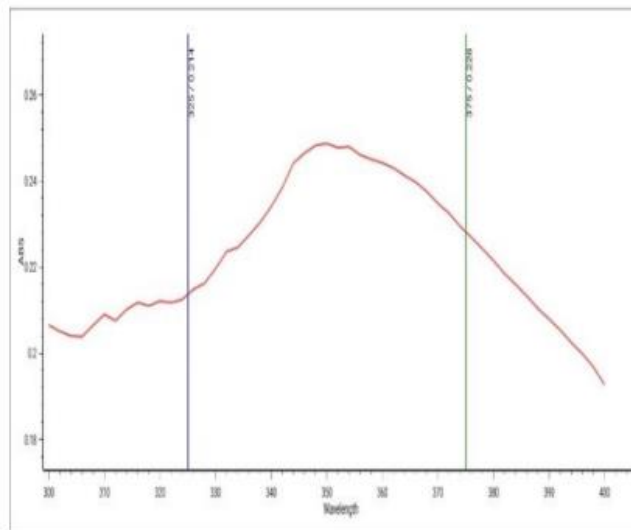
Lama biosintesis	Konsentrasi (g/mL)									
	0.05		0.1		0.15		0.2		0.25	
	λ maks. (nm)	Abs.	λ maks. (nm)	Abs.	λ maks. (nm)	Abs.	λ maks. (nm)	Abs.	λ maks. (nm)	Abs.
1 hari	301	0.415	301	0.382	305	0.493	302	0.113	306	0.358
2 hari	326	0.845	352	0.990	349	0.865	341	0.567	348	0.964
3 hari	327	0.677	354	1.006	354	0.966	350	0.862	352	0.717
4 hari	350	0.870	356	1.087	365	0.791	354	0.917	356	0.907
5 hari	351	0.854	360	0.896	356	1.024	356	1.083	352	0.829
6 hari	364	0.973	362	0.662	356	0.749	360	0.676	355	0.747
7 hari	370	0.448	370	0.479	360	0.654	366	0.237	352	0.735

Lama waktu inkubasi optimum larutan supernatan isolat BES 6A dengan prekursor $ZnSO_4$ menunjukkan hasil yang

berbeda terhadap berbagai variasi konsentrasi. Pada hari ke – 4 sintesis, konsentrasi prekursor 0,1 dan 0,25 g/ml

menunjukkan nilai absorbansi tertinggi dengan nilai masing – masing yaitu 1,087 dan 0,907. Konsentrasi prekursor 0,15 dan 0,2 g/ml menunjukkan nilai absorbansi tertinggi pada hari ke – 5 dengan nilai masing – masing yaitu 1,024 dan 1,083. Adapun konsentrasi prekursor 0,05 g/ml menunjukkan nilai absorbansi tertinggi pada hari ke – 6 yaitu 0,973. Penelitian Hasil analisis Spektrofotometri UV-Vis nanopartikel Zink Oksida

yang dilakukan oleh ¹³ menunjukkan bahwa peningkatan serapan partikel nano menggunakan UV-Vis terjadi pada hari ke – 3. Pada hari terakhir pengamatan proses biosintesis semua variasi konsentrasi prekursor menunjukkan penurunan cukup signifikan dimana konsentrasi 0,2 g/ml menunjukkan absorbansi terendah yaitu 0,237.



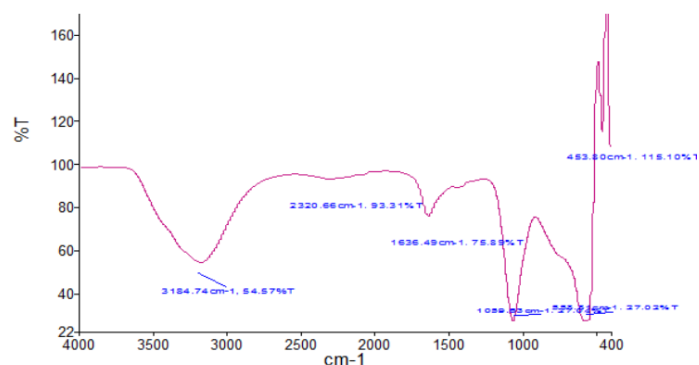
Gambar 2. Hasil penentuan serapan maksimum larutan supernatan isolat bioreduktor BES 6A yang mengandung koloid nanopartikel zink oksida dengan konsentrasi prekursor $ZnSO_4$ 0.2 g/ml menggunakan spektrofotometer UV-Vis

Serapan koloid nanopartikel zink oksida dengan menggunakan bioreduktor BES 6A dan konsentrasi prekursor $ZnSO_4$ 0,2 g/ml terbaca pada panjang gelombang 366 nm dengan absorbansi 0,237 pada hari ke tujuh. Adapun nilai absorbansi paling tinggi diperoleh pada hari ke lima sehingga dapat disimpulkan sebagai waktu optimum untuk mensintesis nanopartikel zink oksida. Biosintesis nanopartikel yang dilakukan Balraj *et al.* (2016) menggunakan

bioreduktor *Streptomyces sp.* Memiliki nilai serapan pada panjang gelombang 364 nm.

Biosintesis nanopartikel yang dilakukan oleh Miri *et al.* (2019) juga menunjukkan spektrum UV-Vis pada panjang gelombang yang serupa yaitu 362 nm. Adanya plasmon pada permukaan partikel dan pita serapan yang dihasilkan dari transisi elektron pita valensi menjadi pita konduksi ($O2p \rightarrow Zn3d$) menghasilkan serapan yang khas.

Hasil Analisis dengan Spektroskopi FTIR

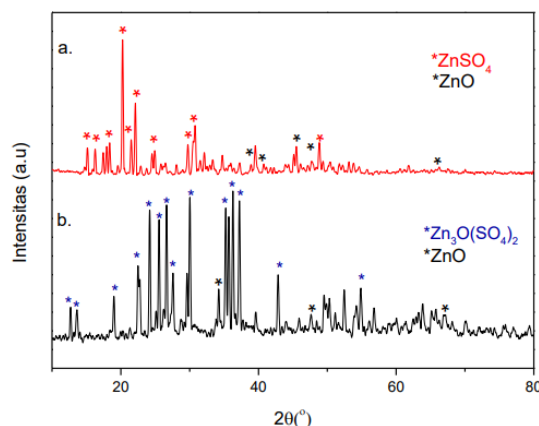


Gambar 3. Hasil penentuan gugus fungsi rendemen nanopartikel zink oksida yang disintesis menggunakan isolat bioreduktor BES 6A dengan konsentrasi precursor ZnSO_4 0.2 g/ml menggunakan FTIR

Spektra FTIR rendemen nanopartikel zink oksida menunjukkan puncak – puncak vibrasi Zn-O dan gugus fungsional tertentu. Vibrasi Zn-O diindikasikan terbentuk pada rentang 400 cm^{-1} hingga 600 cm^{-1} atau dikenal juga sebagai area *finger print*. Hasil uji FTIR menunjukkan pada puncak 553.31 cm^{-1} dan 453.80 cm^{-1} . Penelitian yang dilakukan oleh Miri *et al.* (2019) juga menunjukkan vibrasi Zn O-Zn pada 438 cm^{-1} . Adapun Kundu *et al.* (2014) menemukan vibrasi Zn – O pada puncak 530 cm^{-1} . Pada puncak 1636.49 cm^{-1} mengindikasikan kelompok fungsional yaitu C=O sementara puncak 1059.53 cm^{-1} menandakan kelompok C-O. Ikatan tersebut berasal

dari komponen heterosiklik dan amida protein yang ada pada larutan supernatan. Selain itu ikatan tersebut yang nantinya akan menjadi *capping ligand* dari nanopartikel zink oksida yang terbentuk. Adapun puncak 2320.66 cm^{-1} menandakan kelompok C-H serta puncak 3184.76 cm^{-1} menandakan keberadaan kelompok hidroksil O-H. Keberadaan gugus O – H dikarenakan suhu yang digunakan untuk mengeringkan koloid nanopartikel yang terbentuk yaitu 80°. Pengukuran rendemen ini dilakukan untuk mengetahui gugus fungsi yang terlibat dalam proses sintesis.

Hasil analisis XRD

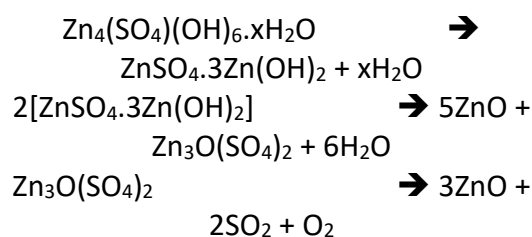


Gambar 8. Hasil penentuan kristalinitas (a) rendemen / sebelum di *furnace* dan (b) bubuk / setelah di *furnace* nanopartikel zink oksida yang disintesis menggunakan isolat bioreduktor BES 6A dengan konsentrasi precursor $ZnSO_4$ 0.2 g/ml menggunakan XRD

Gambar 8 (a) menunjukkan pola XRD rendemen nanopartikel zink oksida hasil sintesis isolat BES 6A dengan prekursor $ZnSO_4$ 0,2 g/ml. Sampel di skrining pada rentang 2θ $10^\circ - 140^\circ$. Puncak kristalinitas nanopartikel zink oksida menunjukkan bentuk kristal kubik. Adapun puncak 2θ yang terdeteksi yaitu $39,1^\circ$; $45,4^\circ$; $66,2^\circ$; $79,7^\circ$; $84,0^\circ$; $101,2^\circ$; $114,8^\circ$; $119,6^\circ$; dan $142,5^\circ$ yang menandakan kehadiran nanopartikel zink oksida berdasarkan referensi ICDD 01-078-4608.

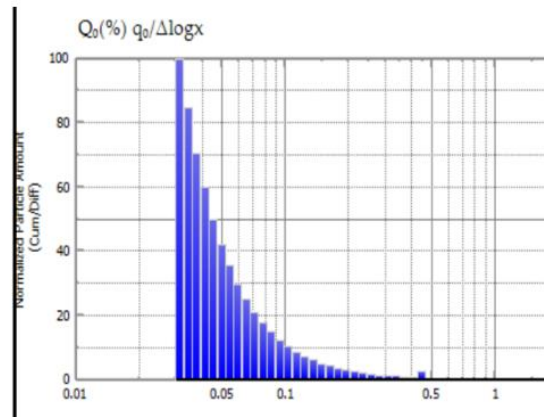
Pada Gambar 8 (b) menunjukkan pola XRD nanopartikel zink oksida hasil sintesis isolat BES 6A dengan prekursor $ZnSO_4$ 0,2 g/ml yang telah di *furnace* pada suhu $700^\circ C$ selama 5 jam. Puncak kristalinitas nanopartikel zink oksida menunjukkan bentuk kristal heksagonal. Adapun puncak 2θ yang terdeteksi yaitu $31,82^\circ$; $34,33^\circ$; $36,49^\circ$; $47,56^\circ$; $57,16^\circ$; $63,20^\circ$; $66,76^\circ$; dan $68,99^\circ$ yang menandakan kehadiran nanopartikel zink oksida berdasarkan referensi ICDD 00-001-1136.

Temperatur yang digunakan pada saat *furnace* juga berpengaruh terhadap perubahan senyawa yang terbentuk. Pada suhu $175^\circ C - 350^\circ C$ terjadi proses dekomposisi dan terbentuknya zink oksida serta zink oxy-sulphate. Pembentukan $Zn_3O(SO_4)_2$ terjadi pada suhu $350^\circ C$. Adapun terbentuknya senyawa zink oksida dari uraian zink oksida sulfat terjadi pada suhu $600^\circ C - 800^\circ C$ ¹⁹. Berikut reaksi kimia yang terjadi pada saat biosintesis yaitu:



Hasil penentuan kristalinitas nanopartikel zink oksida yang dihasilkan masih mengandung zat pengotor senyawa sulfat. Hal ini dikarenakan proses pencucian senyawa garam tersebut belum sempurna. Adapun penggunaan suhu tinggi dapat mempengaruhi bentuk kristalinitas nanopartikel yang terbentuk.

Hasil analisis PSA



Skrining bakteri bio reduktor nanopartikel Zink Oksida

Skrining biosintesis dilakukan untuk mengetahui kemampuan isolat BES untuk menghasilkan nanopartikel zink oksida. Terdapat beberapa indikator yang menandakan terbentuknya nanopartikel zink oksida yaitu: adanya endapan putih yang terbentuk pada permukaan tabung¹¹, perubahan warna larutan dari bening hingga menjadi keruh¹², serta serapan pada rentang panjang gelombang 340 – 373 nm menggunakan spektrofotometer UV-Vis¹³.

Nilai absorbansi menunjukkan kerapatan partikel didalam larutan sehingga dapat menghambat pantulan cahaya UV yang ditembakkan oleh alat spektrofotometer UV-Vis. Berdasarkan hal tersebut semakin keruh larutan yang terbentuk berbanding lurus dengan meningkatnya nilai absorbansi spektrum UV-Vis. Bakteri BES 02 menunjukkan nilai absorbansi paling tinggi pada panjang gelombang 360 nm senilai 1,065. Biosintesis nanopartikel yang dilakukan oleh Miri *et al.* (2019) juga menunjukkan spektrum UV-Vis pada panjang gelombang yang serupa yaitu 362 nm¹⁴. Puncak yang terbentuk pada spektrum UV-Vis disebabkan adanya transfer elektron dari valensi terhadap pita konduksi pada celah pita utama zink oksida, O2p terhadap Zn3d¹⁵. Adapun nilai absorbansi paling rendah yaitu dimiliki oleh isolat BES 01 pada panjang gelombang 359 nm senilai 0,032.

Zink merupakan elemen aktif dan memiliki sifat reduksi yang kuat sehingga lebih mudah teroksidasi membentuk zink

oksida. Mekanisme biosintesis nanopartikel zink oksida dibantu oleh adanya potensial elektro kinetik negatif pada sel bakteri sehingga dapat menarik kation logam¹⁶. Hal ini menyebabkan terjadinya konversi kimia oleh protein dan karbohidrat yang dihasilkan isolat bio reduktor pada larutan supernatan. Selain itu hal tersebut juga dipengaruhi oleh keberadaan gugus fungsi pada senyawa bioaktif (gugus amino, sulfat, karboksil, dan hidroksil) yang dihasilkan baik intraseluler maupun ekstraseluler oleh isolate bakteri¹³. Senyawa tersebut menyebabkan terjadinya proses biotransformasi. Oleh karena itu metode green sintesis dapat bertindak sebagai pereduksi sekaligus menstabilkan nanopartikel yang terbentuk.

Pada green biosintesis ekstraseluler, larutan supernatan sangat berperan penting dalam proses sintesis. Senyawa yang berperan penting yaitu berupa enzim, protein, dan metabolit yang dihasilkan oleh mikroba tersebut⁵. Selain itu pada larutan supernatan terdapat enzim NADPH

reduktase yang menyebabkan reaksi reduktasi dengan mentransfer elektron kepada ion zinc agar membentuk nanopartikel⁶. Berdasarkan hal tersebut green sintesis ekstraseluler lebih menguntungkan untuk diterapkan dalam skala industri karena dapat menghasilkan produk hasil sintesis dalam skala besar dan metode pemurnian produk hasil lebih sederhana.

Metode green biosintesis nanopartikel Zink Oksida secara ekstraseluler berhasil ditemukan oleh Kundu *et al.* (2014) dengan menggunakan larutan supernatant isolat *Rhodococcus pyridinivorans* NT2. Perubahan warna yang terjadi yaitu larutan bening menjadi bewarna putih keruh. Adapun grup fungsional yang terlibat yaitu amino, sulfat, karboksil, dan hidroksil.

Balraj *et al.* (2016) juga berhasil mengembangkan metode green biosintesis nanopartikel Zink Oksida secara ekstraseluler dengan ukuran diameter 20 – 50 nm menggunakan bioreduktor *Streptomyces* sp.. Larutan supernatant optimum yang digunakan untuk memperoleh nanopartikel Zink Oksida yaitu sebanyak 1,5 mL. Selama proses sintesis terjadi perubahan warna dari hijau gelap menjadi putih susu yang mengindikasikan pembentukan nanopartikel Zink Oksida. Adapun pada penelitian yang dilakukan oleh Saravanan *et al.* (2018) juga melakukan biosintesis ekstraseluler dengan menggunakan supernatant dari inokulum *B. megaterium* sebanyak 100 mL. Nanopartikel yang diperoleh dari penelitian tersebut memiliki diameter 45 – 95 nm dan ditandai dengan adanya endapan putih pada bagian permukaan tabung Erlenmeyer.

Enzim nitrat reductase akan mengkatalisis reaksi perombakan nitrat menjadi nitrit. Bioreduksi ion Zn^{2+} diinisiasi

oleh adanya transfer electron dari NADH yang dibantu oleh enzim NADH-reduktase, berperan sebagai pembawa electron. Elektron yang diperoleh ion Zn^{2+} akan bereduksi menjadi muatan nol¹⁷. Penelitian yang dilakukan oleh¹³ membuktikan keberadaan enzim NADH-reduktase dengan berat molekul 43 kDa pada pengujian SDS-PAGE larutan supernatant inokulum bakteri *Rhodococcus pyridinivorans* NT2. Akan tetapi proses biosintesis yang bersifat enzimatik ini dapat dipengaruhi oleh adanya pemanasan selama proses sintesis sehingga dapat mempengaruhi mutu partikel nano yang terbentuk¹⁸.

Penambahan prekursor $ZnSO_4$ menyebabkan perubahan warna pada larutan supernatant isolat BES 6A dari coklat muda bening menjadi kuning keemasan bening dengan endapan pada bagian permukaan larutan. Konsentrasi prekursor $ZnSO_4$ 0,2 g/ml menunjukkan nilai absorbansi paling rendah yaitu 0,237 pada panjang gelombang optimum 366 nm.

Biosintesis nanopartikel yang dilakukan oleh S. Rehman *et al.* (2019) juga menunjukkan serapan pada panjang gelombang yang serupa yaitu pada 354 nm. Peningkatan konsentrasi prekursor yang ditambahkan pada larutan supernatant isolat BES 6A dapat meningkatkan nilai absorbansi koloid nanopartikel yang terbentuk. Akan tetapi pada konsentrasi 0,2 g/ml terjadi penurunan nilai absorbansi menjadi 0,237 dan merupakan nilai paling rendah.

Serapan koloid nanopartikel zink oksida dengan menggunakan bioreduktor BES 6A dan konsentrasi prekursor $ZnSO_4$ 0,2 g/ml terbaca pada panjang gelombang 366 nm dengan absorbansi 0,237 pada hari ke tujuh. Adapun nilai absorbansi paling tinggi diperoleh pada hari ke lima sehingga dapat

disimpulkan sebagai waktu optimum untuk mensintesis nanopartikel zink oksida. Biosintesis nanopartikel yang dilakukan Balraj *et al.* (2016) menggunakan bioreduktor *Streptomyces sp.* Memiliki nilai serapan pada panjang gelombang 364 nm.

Biosintesis nanopartikel yang dilakukan oleh Miri *et al.* (2019) juga menunjukkan spektrum UV-Vis pada panjang gelombang yang serupa yaitu 362 nm. Adanya plasmon pada permukaan partikel dan pita serapan yang dihasilkan dari transisi elektron pita valensi menjadi pita konduksi ($O2p \rightarrow Zn3d$) menghasilkan serapan yang khas.

Spektra FTIR rendemen nanopartikel zink oksida menunjukkan puncak – puncak vibrasi Zn-O dan gugus fungsional tertentu. Vibrasi Zn–O diindikasikan terbentuk pada rentang 400 cm^{-1} hingga 600 cm^{-1} atau dikenal juga sebagai area *finger print*. Hasil uji FTIR menunjukkan pada puncak 553.31 cm^{-1} dan 453.80 cm^{-1} . Penelitian yang dilakukan oleh Miri *et al.* (2019) juga menunjukkan vibrasi Zn O-Zn pada 438 cm^{-1} . Adapun Kundu *et al.* (2014) menemukan vibrasi Zn – O pada puncak 530 cm^{-1} . Pada puncak 1636.49 cm^{-1} mengindikasikan kelompok fungsional yaitu C=O sementara puncak 1059.53 cm^{-1} menandakan kelompok C–O. Ikatan tersebut berasal dari komponen heterosiklik dan amida protein yang ada pada larutan supernatan. Selain itu ikatan tersebut yang nantinya akan menjadi *capping ligand* dari nanopartikel zink oksida yang terbentuk. Adapun puncak 2320.66 cm^{-1} menandakan kelompok C–H serta puncak 3184.76 cm^{-1} menandakan keberadaan kelompok hidroksil O–H. Keberadaan gugus O – H dikarenakan suhu yang digunakan untuk mengeringkan koloid nanopartikel yang terbentuk yaitu 80°. Pengukuran rendemen ini dilakukan untuk

mengetahui gugus fungsi yang terlibat dalam proses sintesis.

SIMPULAN

Bakteri *Bacillus spp* dengan kode BES 01, BES 02, BES 03, BES 05, BES 6A, BES 6B, BES 7A, dan BES 08 yang digunakan pada proses Green biosintesis nanopartikel zink oksida menunjukkan hasil yang berbeda. Isolat BES 02 menunjukkan serapan tertinggi pada hasil pengukuran Spektrofotometri UV-Vis. Selanjutnya dilakukan optimasi pada isolat BES 6A dengan perlakuan variasi konsentrasi precursor zink sulfat yang ditambahkan serta pengamatan terhadap durasi Green biosintesis. Peningkatan konsentrasi menunjukkan serapan maksimum yang berbeda dan terus bertambah kecuali pada konsentrasi 0,2 g/ml. Akan tetapi pada konsentrasi tersebut menunjukkan serapan maksimum tertinggi pada hari ke 5 dengan nilai 1,083. Berdasarkan hasil pengukuran spektrofotometri UV-Vis panjang gelombang optimum koloid nanopartikel yang dihasilkan dari proses Green biosintesis isolate BES 6A dengan penambahan zink sulfat sebanyak 0,2 g/ml yaitu pada 366 nm. Adapun gugus fungsi Zn-O berdasarkan pengukuran FTIR terbaca pada panjang puncak gelombang 438 dan 530 cm^{-1} . Bentuk kristal yang dihasilkan yaitu heksagonal dengan puncak 2θ yang terdeteksi yaitu 31,82°; 34,33°; 36,49°; 47,56°; 57,16°; 63,20°; 66,76°; dan 68,99° yang menandakan kehadiran nanopartikel zink oksida berdasarkan referensi ICDD 00-001-1136. Ukuran nanopartikel yang dihasilkan yaitu 30 – 47 nm.

DUKUNGAN FINANSIAL

Hibah penelitian Program Pascasarjana Universitas Andalas Tahun Ajaran 2021.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih ditujukan kepada Unit Penelitian dan Pengabdian Masyarakat (UPPM) FK UNTAR, dr. Fransiska Farah, Sp.A, M. Kes., serta RSUD Abdul Manap Kota Jambi.

DAFTAR PUSTAKA

1. Amiri A, Dehkordi R, Heidarnejad M, Dehkordi M. Effect of the zinc oxide nanoparticles and thiamine for the management of diabetes in alloxan induced mice: a stereological and biochemical study. *Biol Trace Elem Res.* 2018;181:258–64.
2. Senapati VA, Gupta GS, Pandey AK, Shanker R, Dhawan A, Kumar A. Zinc oxide nanoparticle induced age dependent immunotoxicity in BALB/c mice. *Toxicol Res.* 2017;6(3):342–52.
3. Ahmed S, Annu, Chaudhry SA, Ikram S. A review on biogenic synthesis of ZnO nanoparticles using plant extracts and microbes: a prospect towards green chemistry. *J Photochem Photobiol B Biol.* 2017;166:272–84.
4. Keat CL, Aziz A, Eid AM, Elmarzugi NA. Biosynthesis of nanoparticles and silver nanoparticles, *Bioresour. Bioprocess.* 2015;2(1):1–11.
5. Yusof H, Mohamad R, Zaidan U, Rahman N. Sustainable microbial cell nanofactory for zinc oxide nanoparticles production by zinc-tolerant probiotic *Lactobacillus plantarum* strain TA4. *Microb Cell Fact.* 2020;19(10).
6. Iqtedar M, Riaz H, Kaleem A, Abdullah R, Aihetasham A, Naz S, et al. Biosynthesis, optimization, and characterization of ZnO nanoparticles using *Bacillus cereus* MN181367 and their antimicrobial activity against multidrug resistant bacteria. *Rev Mex Ing Quim.* 2020;19(1).
7. Tiwari V, Mishra N, Gadani K, Solanki PS, Shah NA, Tiwari M. Mechanism of anti-bacterial activity of zinc oxide nanoparticle against carbapenem-resistant acinetobacter baumannii. *Front Microbiol.* 2018;9.
8. Balraj B, Senthikumar N, Siva C, Krithikadevi R, Julie A, Potheher I V., et al. Synthesis and characterization of zinc oxide nanoparticles using marine streptomyces sp. with its investigations on anticancer and antibacterial activity. *Res Chem Intermed.* 2016;42(11).
9. Saravanan M, Gopinath V, Chaurasia MK, Syed A, Ameen F, Purushothaman N. Green synthesis of anisotropic zinc oxide nanoparticles with antibacterial and cytofriendly properties. *Microb Pathog.* 2018;115:57–63.
10. Sarina G, Hanifa D, Armenia,

- Djamaan A. Screening of endophytic bacteria from surian leaves (*Toona sinensis* (Juss.) M.roem as silver nanoparticles reducing agent. IOSR-JPBS. 2020;15(2):16–22.
11. Pomastowski P, Krol-Gorniak A, Railean-Plugaru V, Buszewski B. Zinc oxide nanocomposites - Extracellular synthesis, physicochemical characterization and antibacterial potential. *Materials (Basel)*. 2020;13:43–7.
 12. Eltarahony M, Zaki S, El-Kady M, Abd-El-Haleem D. Biosynthesis, characterization of some combined nanoparticles, and its biocide potency against a broad spectrum of pathogens. *Hindawi J Nanomater*. 2018;2018.
 13. Kundu D, Hazra C, Chatterjee A, Chaudhari A, Mishra S. Extracellular biosynthesis of zinc oxide nanoparticles using *Rhodococcus pyridinivorans* NT2: multifunctional textile finishing, biosafety evaluation and in vitro drug delivery in colon carcinoma. *J Photochem Photobiol B Biol*. 2014;140:194–204.
 14. Miri A, Mahdinejad N, Ebrahimi O, Khatami M, Sarani M. Zinc oxide nanoparticles: Biosynthesis, characterization, antifungal, and cytotoxic activity. *Mater Sci Eng C*. 2019;104.
 15. Khorsand Zak A, Abd Majid WH, Mahmoudian MR, Darroudi M, Yousefi R. Strach-stabilized synthesis of ZnO nanopowders at low temperature and optical properties study. *Adv Powder Technol*. 2013;24:618–24.
 16. Mahdi ZS, Roshan FT, Nikzad M, Ezoji H. Biosynthesis of zinc oxide nanoparticles using bacteria: a study on the characterization and application for electrochemical determination of bisphenol A. *Inorg nano-metal Chem*. 2020;
 17. Hulkoti N, Taranath T. Biosynthesis of nanoparticles using microbes- a review. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2014;121:474–83.
 18. Sneha K, Sathishkumar M, Mao J, Kwak I, Yun Y. *Corynebacterium glutamicum*-mediated crystalization of silver ions through sorption and reduction processes. *Chem Eng J*. 2010;162:989–96.
 19. Rehman S, Jermy BR, Akhtar S, Borgio JF, Azeez SA, Ravinayagam V, et al. Isolation and characterization of a novel thermophile: *Bacillus haynesii*, applied for the green synthesis of ZnO nanoparticles. *Artif CELLS, NANOMEDICINE, Biotechnol*. 2019;47(1):2072–82.
 20. Nobel Surya P., Arul D, Aiswarya D, Perumal P. Extracellular biosynthesis, characterization and cytotoxic effects of zinc oxide nanoparticles synthesized from the supernatant of probiotic bacterium, *Bacillus amyloliquefaciens* CS4. *Int J Sci Technol Res v*. 2019;8(09).

