



Pigmen Pyocyanine dari Isolat *Pseudomonas aeruginosa* Sebagai Agen Antibakteri terhadap *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus* (MRSA)

Pyocyanin Pigment from Pseudomonas aeruginosa Isolate as Antibacterial Agent Against Methicillin Resistant Staphylococcus aureus (MRSA)

Dewi Kunthy Saraswati¹, Ana Hidayati Mukaromah², Wildiani Wilson^{3*}

¹Program Studi D-IV Teknologi Laboratorium Medis, Universitas Muhammadiyah Semarang

²Program Studi D-III Teknologi Laboratorium Medis, Universitas Muhammadiyah Semarang

³Program Studi Magister Sains Laboratorium Medis, Universitas Muhammadiyah Semarang

Corresponding author: wildianiwilson@unimus.ac.id*, dewikhunty@gmail.com,
ana_hidayati@unimus.ac.id

Riwayat Artikel: Dikirim; Diterima; Diterbitkan

Abstrak

Bakteri merupakan salah satu mikroba patogen penyebab infeksi. Sebanyak 42,1 % penyakit infeksi terutama pada kulit disebabkan oleh bakteri *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*). Bakteri patogen yang resisten terhadap antibiotik menjadi ancaman paling serius keberhasilan pengobatan penyakit yang disebabkan mikroba, sehingga dibutuhkan agen antibakteri alami. Tujuan dari penelitian ini adalah mengisolasi pigmen pyocyanin dari isolat *Pseudomonas aeruginosa* dan mengetahui aktivitas antibakteri pigmen pyocyanin terhadap bakteri *Methicillin Resistance Staphylococcus aureus* (MRSA). Metode: Produksi pyocyanin dengan cara pengambiliran dari supernatan. Aktivitas antibakteri menggunakan metode difusi sumuran dengan media MHA. Hasil: Aktivitas antibakteri metode sumuran dari pigmen pyocyanin terhadap MRSA ditandai dengan terbentuknya zona hambat di sekitar sumuran pada konsentrasi 100% sampai 50% berturut-turut 27, 26, 26, 25, 23, dan 22 mm. Kesimpulan: Konsentrasi pigmen pyocyanin dapat menghambat pertumbuhan MRSA adalah 50%.

Kata kunci: Pigmen pyocyanin, *Pseudomonas aeruginosa*, MRSA

Abstract

Bacteria are one of the pathogenic microbes that cause infections. As many as 42.1% of infectious diseases, especially in the skin, are caused by Staphylococcus aureus (S. aureus). Pathogenic bacteria that are resistant to antibiotics pose the most serious threat to the success of the treatment of diseases caused by microbes, so natural antibacterial agents are needed. The purpose of this research is to isolate pyocyanin pigment from Pseudomonas aeruginosa isolate and to know the antibacterial activity of pyocyanin pigment against Methicillin Resistance Staphylococcus aureus (MRSA). Method: Pyocyanin production by taking from the supernatant. Antibacterial activity using the diffusion method of wells with MHA media. Results: The antibacterial activity of the well method from the pyocyanin pigment against MRSA was characterized by the formation of inhibitory zones around the well at 100% to 50% concentrations respectively 27, 26, 26, 25, 23, 23 and 22 mm. Conclusion: Minimum concentrations of pyocyanin pigments can inhibit MRSA growth is 50%.

Keywords: Pyocyanin pigment, *Pseudomonas aeruginosa*, MRSA.

PENDAHULUAN

Bakteri merupakan salah satu mikroba patogen penyebab infeksi (Radji, 2011). Sebanyak 42,1% penyakit infeksi terutama pada kulit disebabkan oleh *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) yang juga menjadi penyebab tertinggi angka kesakitan (Rosalina, 2010; Jacobson *et al.*, 1988; Witt *et al.*, 1987; Onorato *et al.*, 1999). Penanganan penyakit infeksi yang disebabkan mikroba umumnya digunakan antibiotik kimia yang telah disintesis. Apabila



penggunaan antibiotik yang tidak sesuai dengan prosedur, maka akan menyebabkan berkembangnya strain bakteri yang lebih resisten terhadap antibiotik tersebut (Raghunath, 2008).

Bakteri patogen yang resisten terhadap antibiotik menjadi ancaman paling serius keberhasilan pengobatan penyakit yang disebabkan mikroba (Cordell, 2000). Salah satunya *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus* (MRSA) yang merupakan strain dari *S. aureus* yang resisten terhadap *isoxazol penicillin* seperti *methicillin*, *oxacillin* dan *flucloxacillin*, sehingga dibutuhkan agen antibakteri alami.

Antibakteri alami dapat diperoleh dari tanaman maupun dari mikroorganisme (Nair dan Chanda, 2007). Penelitian tentang antibakteri yang berasal dari sumber mikroorganisme berupa pigment bakteri juga dipertimbangkan, salah satunya yaitu pigmen pyocyanin dari *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*). Pigmen pyocyanin merupakan produksi dari senyawa phenazine biru-hijau yang larut dalam air. Pyocyanin telah digunakan sebagai pewarna reversibel dengan potensi redoks mirip dengan menaquinone. Berbagai efek farmakologis dari pyocyanin pada sel prokariotik yaitu aktivitas biologisnya terkait dengan kesamaan dalam struktur kimianya dengan *isoalloxazine*, *flavoprotein*, *flavin mononucleotide* dan *flavin adenine dinucleotide*. (Ohfuji *et al.*, 2004).

METODE

Produksi Pigmen Pyocyanine

Penelitian ini menggunakan *potato gliserol broth* sebagai media untuk kultur cair *P. aeruginosa* (Young, 1947). *Potato broth* yang digunakan adalah sari kentang yang berasal dari air rebusan kentang. Komposisi media *potato gliserol broth* adalah 100 ml *Nutrient Broth* kemudian ditambah dengan gliserin dan *potato broth* masing-masing sebanyak 1%. Campuran ketiga media tersebut disterilisasi terlebih dahulu sebelum diinokulasi *P. aeruginosa*.

P. aeruginosa yang sudah di subkultur kemudian dipanen dan diinokulasikan ke dalam media kultur cair dengan masa inkubasi satu minggu pada suhu 37° C pembentukan pigmen.

Kultur cair *P. aeruginosa* disentrifuse dengan kecepatan 9000 rpm selama 15 menit untuk mendapatkan supernatan yang mengandung pigmen pyocyanin. Supernatan pertama disentrifuse kembali dan supernatan terakhir yang mengandung 100% pyocyanin disterilkan menggunakan filter unit dengan membran Sartorius filter 0.45 µm. Kepekatan supernatan ditentukan melalui pembacaan spektrofotometer dengan panjang gelombang sinar 520 nm, dan dilakukan pembacaan baku menggunakan *Methylen Blue* pada panjang gelombang yang sama. Pembuktian sterilitas supernatan dilakukan dengan cara menginokulasi supernatan tersebut pada media *Nutrient Agar* (NA) kemudian diinkubasi pada suhu ruang selama 24 jam. Jika terdapat pertumbuhan bakteri maka supernatan tersebut masih mengandung kontaminan sehingga harus difilter ulang.

Pemurnian Bakteri

Bakteri MRSA terlebih dahulu diremajakan menggunakan media BHI kemudian diinokulasi pada media MSA kemudian disuburkan pada media BAP pada suhu 37°C selama 24 jam.

Uji Aktivitas Antibakteri

Aktivitas antibakteri ekstrak pigmen pyocyanin dari isolat *P. aeruginosa* terhadap bakteri MRSA dievaluasi menggunakan uji *agar well diffusion assay* (Perez *et al.*, 1990). Sebanyak 100 µl kultur 24 jam dari organisme uji, setara dengan standar *McFarland* 0,5 lalu diinokulasi



pada MHA dengan ketebalan 6 mm, kemudian disebarakan ke permukaan media menggunakan *triangle glass*. Setelah inokulasi 10 menit, sumuran disiapkan dengan bantuan *cork borer* dengan diameter 5 mm. Tiga sumur dibuat di cawan, dan masing-masing sumur diisi dengan 100 μ L pigmen pyocyanin dengan konsentrasi 100% - 10%. Sebagai kontrol positif digunakan antibiotik standar *Vancomycin*. Semua cawan kemudian diinkubasi secara aerob pada suhu 37°C selama 16 jam. Aktivitas antibakteri pigment pyocyanin dari isolat *P. aeruginosa* ditentukan dengan mengukur diameter zona penghambat dan membandingkannya dengan hasil penghambatan menggunakan antibiotik standar. Zona hambat diukur pada sudut silang dan diambil sebagai rata-rata tiga pengukuran independen.

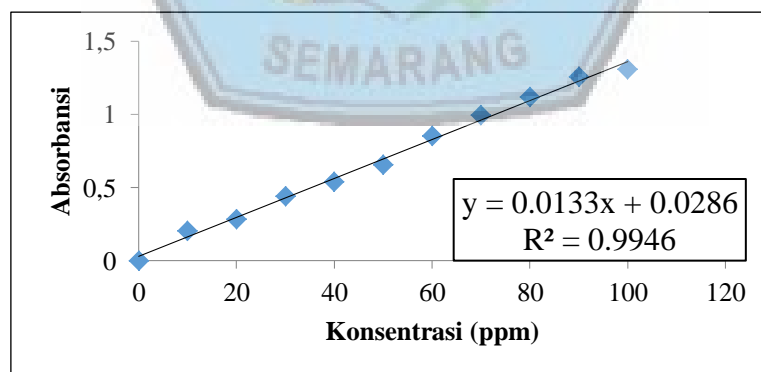
HASIL DAN PEMBAHASAN

Absorbansi Baku Methylen Blue

Absorbansi pada baku *Methylen Blue* 100 sampai dengan 10 ppm pada panjang gelombang 520 nm dan hasil pembacaan baku pada Spektrofotometri UV-Vis ditunjukkan pada Tabel 1 dan kurva baku ditunjukkan pada Gambar 1.

Tabel 1. Nilai Absorbansi Baku Methylen Blue (520 nm)

Baku (ppm)	Absorbansi
100	1.307
90	1.257
80	1.118
70	0.993
60	0.852
50	0.656
40	0.540
30	0.439
20	0.285
10	0.203



Gambar 1. Kurva Baku *Methylene Blue*

Hasil pengolahan data didapatkan persamaan garis $y = 0,0133x + 0,0286$ dengan $R^2 = 0,9946$.

Kadar Pyocyanin dengan Variasi Konsentrasi

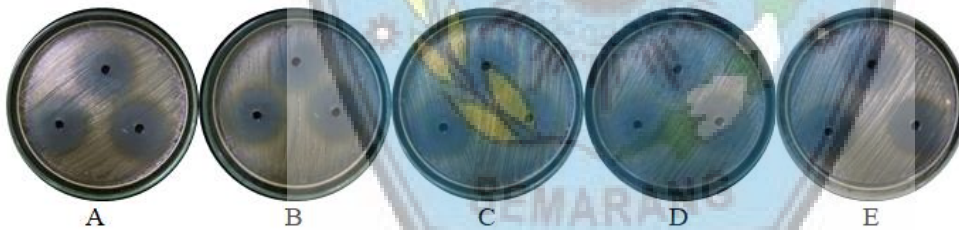
Pembacaan kepekatan supernatan pigmen pyocyanin ditentukan melalui pembacaan spektrofotometer dengan panjang gelombang sinar 520 nm. Absorbansi pigmen pyocyanin yang diperoleh ditunjukkan pada Tabel 2.

Tabel 2. Nilai Absorbansi Pigmen Pyocyanin (520 nm)

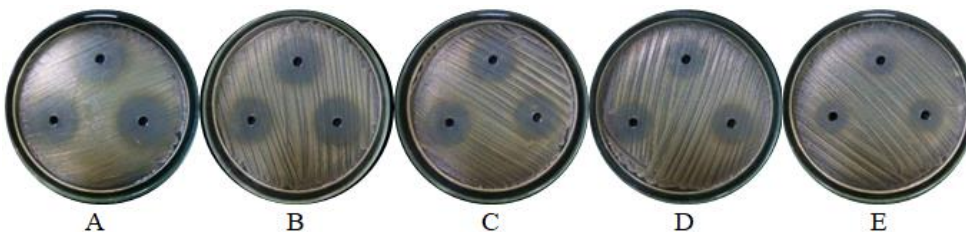
Variasi Konsentrasi (%)	Absorbansi	Kadar Sampel (ppm)	Konsentrasi
100	1,137	83,338	
90	0,978		71,383
80	0,896		65,218
70	0,775		56,120
60	0,656		47,172
50	0,614		44,015
40	0,478		33,789
30	0,390		27,172
20	0,334		22,962
10	0,190		12,135

Uji Aktivitas Antibakteri

Hasil pengujian aktivitas antibakteri pigmen pyocyanin dari isolat *P. aeruginosa* terhadap MRSA ditandai dengan terbentuknya diameter zona hambat di sekitar sumuran. Hasil pengamatan zona hambat ditunjukkan pada Gambar 2 dan 3. Kontrol positif menggunakan antibiotik *Vancomycin* ditunjukkan pada Gambar 4.



Gambar 2. (A) Konsentrasi 100%, (B) Konsentrasi 90%, (C) Konsentrasi 80%, (D) Konsentrasi 70%, (E) Konsentrasi 60%



Gambar 3. (A) Konsentrasi 50%, (B) Konsentrasi 40%, (C) Konsentrasi 30%, (D) Konsentrasi 20%, (E) Konsentrasi 10%.



Gambar 4. Kontrol positif menggunakan antibiotik *Vancomycin*

Hasil penelitian rata-rata zona hambat disajikan pada Tabel 5 yang menunjukkan bahwa rata-rata diameter zona hambat pada konsentrasi pigmen pyocyanin 100% sampai dengan 50% dapat menghambat pertumbuhan MRSA, karena zona hambatnya lebih besar dari kontrol positif *Vancomycin*. Kekuatan daya hambat kontrol positif terhadap MRSA menurut CLSI (2014) ditunjukkan pada Tabel 6.

Tabel 6. Diameter Standar Daya Hambat *Vancomycin*

Diameter Zona Terang (mm)	Respon Hambatan Pertumbuhan
≤ 15	Resisten
16-20	Intermediet
≥ 21	Sensitif

Konsentrasi pigmen pyocyanin 40% sampai dengan 20% kemungkinan tidak berpotensi sebagai senyawa antibakteri karena rata-rata zona hambat yang terbentuk diantara 16-20 mm (intermediet), sedangkan pada konsentrasi 10% tidak berpotensi sebagai senyawa antibakteri karena zona hambatnya ≤ 15 mm.

Methylen Blue digunakan sebagai baku karena warna larutannya mendekati warna pyocyanin pada media *Potato Gliserol Broth* (Gambar 15). Berdasarkan baku *Methylen Blue* yang diperoleh dari pembacaan absorbansi secara spektrofotometri dapat dilihat pada Tabel 3. Persamaan garis yang didapat adalah $y = 0,0133x + 0,0286$ dengan $R^2 = 0,9946$ kemudian didapatkan rumus $x = \frac{y-b}{a}$ yang digunakan untuk menghitung konsentrasi pyocyanin. Nilai x pada konsentrasi pigmen pyocyanin terendah (10%) setara dengan konsentrasi 12,135 ppm, perhitungan ini dilakukan untuk mengetahui kesetaraan konsentrasi pigmen pyocyanin.

Mekanisme pyocyanin dalam menghambat bakteri yaitu dengan cara mengganggu metabolisme sel-sel normal karena pigmen pyocyanin merupakan senyawa eksotoksin yang dikeluarkan oleh *P. aeruginosa* (Hassan and Fridovich, 1980). Menurunnya konsentrasi pyocyanin berhubungan dengan semakin kecilnya zona hambat yang terbentuk, karena pada konsentrasi kecil kandungan pigmen pyocyanin semakin sedikit dengan adanya pengenceran. Salah satu kerja antibakteri dipengaruhi oleh konsentrasinya (Jawetz, *et al.*, 1996). Sejalan dengan penelitian yang dilakukan didapatkan hasil semakin rendah konsentrasi pyocyanin maka zona hambat yang terbentuk semakin kecil, begitu juga sebaliknya (Saha *et al.*, 2008).

Penelitian Alzahrani dan Alqahtani (2016) menghasilkan bahwa ekstrak pigmen pyocyanin dari isolat *P. aeruginosa* mampu menghambat pertumbuhan *S. aureus* ATCC 25923 dengan rata-rata zona hambat sebesar 10.33 mm pada konsentrasi 5 mg/mL, 14.67 mm pada konsentrasi 10 mg/mL, 19.67 mm pada konsentrasi 15 mg/mL, 25 mm pada konsentrasi 20 mg/mL, dan 26.33 mm pada konsentrasi 25 mg/mL.



KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian tentang daya antibakterial pigmen pyocyanin terhadap MRSA, maka dapat diambil beberapa kesimpulan antara lain:

1. Didapatkan isolat pigmen pyocyanin berupa supernatan yang mengandung pyocyanin dari kultur cair *P. aeruginosa*.
2. Konsentrasi terendah pigmen pyocyanin yang memiliki aktivitas antibakteri terhadap pertumbuhan MRSA pada konsentrasi 50%.

DAFTAR PUSTAKA

- Alzahrani, S. H. & Alqahtani, F. S.. (2016). Pyocyanin Pigment Extracted from *Pseudomonas aeruginosa* Isolate as Antimicrobial Agent and Textile Colorant. *IJSR-International Journal Of Scientific Research*. 5 (9), 467-470.
- Cordell GA. 2000. Biodiversity and drug discovery symbiotic relationship. *Phytochemistry*. 55: 463-480.
- Hassan H & Fridovich I (1980). Mechanism of the antibiotic action pyocyanine. *Journal of Bacteriology*. 141 (1): 156–163. PMC 293551. PMID 6243619.
- Jacobson MA, Gellermann H, Chambers H. 1988. *S. aureus* bacteremia and recurrent staphylococcal infection in patients with acquired immunodeficiency syndrome and AIDS-related complex. *Am J Med*. 1988;85(2):172–176.
- Jawetz, E.; Melnick, J.L. dan Adelberg, E.A., 1996, Mikrobiologi Kedokteran, Ed ke-20, penerjemah: Edi Nugroho dan R.F. Maulany, Buku Kedokteran, EGC, Jakarta.
- Nair, R. & Chanda, S.V. 2007. Antibacterial activities of some medicinal plants of Western Region of India. *Turkey J. Biol*. 31: 231-236
- Ohfuji, K., Sato, N., Hamada-Sato, N. and Kobayashi, T. (2004). Construction of a glucose sensor based on a screen-printed electrode and a novel mediator pyocyanin from *Pseudomonas aeruginosa*, *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 19: 1237-1244.
- Onorato M, Borucki MJ, Baillargeon G, et al. 1999. Risk factors for colonization or infection due to methicillin-resistant *S. aureus* in HIV-positive patients: a retrospective case-control study. *Infect Control Hosp Epidemiol*; 20(1):26–30.
- Perez C, Pauli M, and Bazerque P. 1990. An Antibiotic Assay by Agar-well Diffusion Method. *Acta Biologicae et Medecine Experimentaalis*. 15: 113-115.
- Radji, Maksun & Manurung, Juli., 2011, *Buku Ajar Mikrobiologi Panduan Mahasiswa Farmasi Kedokteran*, 98, 99, 107, 153, Buku Kedokteran EGC, Jakarta.
- Raghunath D. 2008. Emerging antibiotic resistance in bacteria with special reference to India. *J. Biosci*. 33(4): 593- 603
- Rosalina D, Martodihardjo S, Listiawan MW, 2010. *S. aureus* as the Most Common Cause of Secondary Infection in All Skin Lesions of Vesicobullous Dermatitis. *Berkala Ilmu Kesehatan Kulit & Kelamin* Vol. 22 No. 2 Agustus 2010.
- Saha, S. Thavasi, R. and Jayalakshmi, S. (2008). Phenazine Pigments from *Pseudomonas aeruginosa* and Their Application as Antibacterial Agent and Food Colourants, *Research Journal of microbiology*, vol.3 (3): 122-128.
- Witt DJ, Craven DE, McCabe WR. 1987; Bacterial infections in adult patients with the acquired immune deficiency syndrome (AIDS) and AIDS-related complex. *Am J Med*. 1987; 82(5):900–906.