



## Uji Aktivitas Antibakteri Glutathion terhadap Infeksi *P. aeruginosa* secara *In Vitro*

Intan Ayu Elissa<sup>✉</sup>, Dewi Mustikaningtyas, Ari Yuniastuti

Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Negeri Semarang, Indonesia

### Info Artikel

Diterima: 1 September  
2020

Disetujui: 30 September  
2020

Dipublikasikan: 15  
November 2020

#### Keywords:

*P. aeruginosa* infection;  
glutathione; antibacterial  
activity

Infeksi *P. aeruginosa*;  
glutathion; aktivitas  
antibakteri

### Abstract

*Pseudomonas aeruginosa* is a gram negative bacterium that is pathogens opportunistic and the cause of nosocomial infections. *P. aeruginosa* is resistant to antibiotics that are often given. The aim of this study is to prove the presence of antibacterial activity of isolated glutathione from *S. cerevisiae* on *P. aeruginosa* infection. The design of this study is a completely randomized design. The variation concentration used was 100%, 75% and 50%. The parameters observed were inhibition zone diameter, turbidity level and the presence or absence of growth in MHA media. The results showed that the diameter of the largest inhibition zone was found at a concentration of 100% which was 7.88 mm and included a moderate inhibition criteria. The clearest solution after 24 hours incubation is a solution with an isolated glutathione concentration of *S. cerevisiae* 100%. While when inoculated into MHA media, all concentrations still produce *P. aeruginosa* growth. It means that the isolated glutathione from *S. cerevisiae* is bacteriostatic. Based on the results of these studies, it can be concluded that the isolation of glutathione from *S. cerevisiae* has antibacterial activity against *P. aeruginosa* so that can be used as an alternative treatment for *P. aeruginosa* infection.

### Abstrak

*Pseudomonas aeruginosa* merupakan bakteri gram negatif yang bersifat patogen oportunistik dan penyebab infeksi nosokomial. *P. aeruginosa* resisten terhadap antibiotik yang sering diberikan. penelitian ini bertujuan untuk membuktikan adanya aktivitas antibakteri dari glutathion hasil isolasi dari *S. cerevisiae* terhadap infeksi *P. aeruginosa*. Rancangan penelitian ini adalah rancangan acak lengkap. Variasi konsentrasi yang digunakan adalah 100%, 75% dan 50%. Parameter yang diamati adalah diameter zona hambat, tingkat kekeruhan dan ada tidaknya pertumbuhan pada media MHA. Hasil penelitian menunjukkan bahwa diameter zona hambat paling luas terdapat pada konsentrasi 100% yaitu 7,88 mm dan termasuk kriteria penghambatan sedang. Larutan yang jernih setelah inkubasi 24 jam adalah larutan dengan konsentrasi glutathion hasil isolasi dari *S. cerevisiae* 100%. Sedangkan ketika diinokulasikan ke media MHA, semua konsentrasi masih menghasilkan pertumbuhan *P. aeruginosa*. Hal tersebut berarti glutathion hasil isolasi dari *S. cerevisiae* bersifat bakteriostatik. Berdasarkan hasil penelitian tersebut, dapat disimpulkan bahwa glutathion hasil isolasi dari *S. cerevisiae* memiliki aktivitas antibakteri terhadap *P. aeruginosa*. Sehingga, glutathion hasil isolasi dari *S. cerevisiae* dapat digunakan sebagai alternatif pengobatan terhadap infeksi *P. aeruginosa*.

## PENDAHULUAN

Pada negara berkembang termasuk Indonesia, infeksi merupakan penyakit yang masih menjadi fokus pengendalian dibidang kesehatan (Mutsaqof *et al.*, 2015). *Pseudomonas aeruginosa* merupakan bakteri gram negatif yang bersifat patogen oportunistik. *P. aeruginosa* sering muncul dalam daftar bakteri penyebab infeksi nosokomial. Pada penelitian yang dilakukan oleh Lutpiatina (2017) menunjukkan bahwa *P. aeruginosa* menjadi salah satu bakteri penyebab infeksi nosokomial di rumah sakit di kota Banjarbaru dengan presentase 17%.

Permasalahan saat ini adalah munculnya sifat resisten *P. aeruginosa* terhadap antibiotik yang sering diberikan untuk pengobatan. Berdasarkan hasil penelitian yang dilakukan di RSUP dr. M. Djamil Padang dengan menggunakan sampel klinis pasien dengan hasil penelitian dari 79 isolat *P. aeruginosa* 27 isolat (34,17%) bersifat MDRPA dan 12 isolat (15,19%) bersifat resisten terhadap satu atau dua jenis antibiotik (Rustini *et al.*, 2016). Munculnya sifat resistensi terhadap antibiotik dapat meningkatkan toksisitas dan dampak buruk bagi tubuh pasien. Selain itu dapat meningkatkan biaya perawatan. Oleh karena itu, diperlukan alternatif pengobatan untuk mengatasi infeksi *P. aeruginosa*.

Menurut Yani & Kangmin (2009) glutathion memiliki potensi digunakan sebagai agen antibakteri. Glutathion adalah tripeptida yang terdiri dari asam amino glisin, asam glutamat dan sistein yang saling terhubung pada ikatan  $\gamma$ -peptida (Yuniastuti, 2016). Glutathion dapat berperan sebagai imunomodulator, antioksidan, dan dapat berperan sebagai antibakteri (Fraternale *et al.*, 2016). Aktivitas antibakteri adalah aktivitas dari suatu senyawa yang memiliki kemampuan untuk mengganggu metabolisme bakteri patogen sehingga berdampak terhadap pertumbuhan bakteri tersebut (Kapoor *et al.*, 2017). Aktivitas antibakteri dapat dilihat menggunakan metode difusi yang dikonfirmasi metode dilusi. Perkembangan saat ini glutathion dapat diproduksi dari *Saccharomyces cerevisiae* dan menggunakan media alternatif dengan harga yang lebih terjangkau. Glutathion yang akan digunakan dalam penelitian ini adalah hasil isolasi dari *S. cerevisiae*.

Adanya efek antibakteri pada glutathion dapat menjadi alternatif pengobatan infeksi yang disebabkan oleh infeksi bakteri *P. aeruginosa*. Kemampuan glutathion yang dapat digunakan sebagai agen antibakteri sangat menguntungkan. Hal tersebut karena mengingat bakteri *P. aeruginosa* bersifat patogen oportunistik sehingga penggunaan glutathion selain sebagai antibakteri juga dapat menjadi antioksidan dan perbaikan imun pasien sehingga mempercepat penyembuhan infeksi. Penelitian ini bertujuan untuk membuktikan adanya aktivitas antibakteri glutathion hasil isolasi dari *S. cerevisiae* terhadap pertumbuhan *P. aeruginosa*.

## METODE

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Biologi FMIPA Universitas Negeri Semarang dan Laboratorium Mikrobiologi FK Universitas Diponegoro pada bulan April-Mei 2019. Sampel yang digunakan adalah biakan murni *P. aeruginosa* yang didapat dari Laboratorium Mikrobiologi FK UNDIP. Variabel bebas dalam penelitian ini meliputi antibiotik Ampicilin, glutathion pabrikan, akuades steril, variasi konsentrasi glutathion hasil isolasi dari *S. cerevisiae* (100%, 75 dan 50%). Variabel terikat yang digunakan antara lain diameter zona hambat, tingkat kejernihan dan ada tidaknya pertumbuhan pada media MHA (*Muller Hinton Agar*). Desain penelitian ini ekperimental laboratoris menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan delapan kali ulangan.

### Produksi Glutathion

Peremajaan kultur *S. cerevisiae* pada media YPD (*Yeast Extract Peptone Dextrose*) cair dan diinkubasi pada shaker inkubator selama 24 jam dengan suhu 30°C. Kemudian suspensi *S. cerevisiae* dibuat dengan cara menginokulasikan 1 ml hasil peremajaan *S. cerevisiae* ke dalam 9 ml media YPD dan diinkubasi pada shaker inkubator selama 16 jam dengan suhu 30°C. Setelah itu, jumlah sel awal diukur dengan spektrofotometer 600 nm (Hingga diperoleh nilai OD (0,2-0,4). Tabung corning disiapkan dan masing-masing di isi dengan 1 ml larutan suspensi *S. cerevisiae* + 9 ml media YPD dan diinkubasi selama 24 jam dengan suhu 30°C pada shaker inkubator. Kemudian masing-masing tabung ditambahkan 1 ml larutan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,2 mM dan di inkubasi selama 1 jam di suhu 30°C (Collinson & Dawes, 1992). Setelah itu, masing-masing tabung ditambah 3 mL larutan sistein asam glutamat (sistein 3,35mM & asam gluamat 10mM). Larutan dihomogenkan dan diinkubasi selama 19 jam di dalam shaker inkubator pada suhu 30°C. Jumlah sel akhir kembali dihitung menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 600 nm.

### Ekstraksi Glutathion

Larutan *S. cerevisiae* di sentrifuge dengan kecepatan 4000 rpm selama 10 menit dan setelah itu antara supernatan dan pelet dipisah. Supernatan sementara disimpan di lemari es (glutathion ekstraseluler). Sedangkan pelet (glutathion intraseluler), di cuci 2 kali menggunakan akuades steril dan di sentrifuge dengan kecepatan 4000 rpm selama 10 menit. Glutathion kemudian diekstraksi menggunakan ethanol 40 % sebanyak 5 ml dan dihomogenkan dengan vortex (Xiong *et al.*, 2009: 1012). Setelah homogen, glutathion diinkubasi pada inkubator dengan suhu 30°C selama 2 jam. Konsentrasi glutathion diukur menggunakan ELISA (*Enzyme-linked Immunosorbent Assay*) pada panjang gelombang 405 nm dengan metode DTNB (5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid)). Hasil absorbansi kemudian di hitung berdasarkan persamaan kurva standar yang di peroleh.

### Uji Aktivitas Antibakteri

Metode difusi menggunakan teknik cakram disk dengan merendam cakram disk pada larutan glutathion hasil isolasi dari *S. cerevisiae* konsentrasi 100%, 75% dan 50%. Kontrol positif

antibiotik ampicilin dan glutathion pabrikan. Kontrol negatif akuades steril. Kemudian diletakkan pada medium MHA yang sudah di inokulasikan *P.aeruginosa* (setara 0,5 Mc. Farland) dan selanjutnya di inkubasi 37°C selama 24 jam. Setelah itu diameter zona hambat yang terbentuk diamati dan diukur dengan penggaris. Metode dilusi dilakukan dengan cara mencampurkan media NB+ suspensi *P. aeruginosa* (setara 0,5 Mc. Farland) + larutan glutathion hasil isolasi dari *S. cerevisiae* (konsentrasi 100%, 75% dan 50%), kontrol positif (ampicilin dan glutathion pabrikan), kontrol negatif (akuades steril). Kemudian diinkubasi 37°C selama 24 jam dan diamati kekeruhan untuk menentukan sifat bakteriostatik. Sedangkan untuk menentukan sifat bakterisid larutan perlakuan sebelumnya diinokulasikan pada media MHA dan diinkubasi 37°C selama 24 jam. selanjutnya diamati ada tidaknya pertumbuhan *P. aeruginosa*.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil pengukuran diameter zona hambat glutathion hasil isolasi dari *S. cerevisiae* terhadap pertumbuhan *P. aeruginosa* dapat dilihat pada Tabel 1.

**Tabel 1.** Rata-Rata Hasil Pengukuran Diameter Zona Hambat Glutathion hasil isolasi dari *S. cerevisiae* terhadap Pertumbuhan *P. aeruginosa*

Kelompok Perlakuan	Diameter Zona Hambat (mm)	Kriteria Hambat
K-	0,00 ± 0,00 <sup>a</sup>	Tidak ada
K+A	7,00 ± 0,54 <sup>bd</sup>	Sedang
K+G	6,63 ± 0,52 <sup>b</sup>	Sedang
P1	7,88 ± 0,64 <sup>c</sup>	Sedang
P2	7,13 ± 0,35 <sup>d</sup>	Sedang
P3	6,13 ± 0,35 <sup>e</sup>	Sedang

Keterangan :

Angka yang diikuti huruf yang berbeda menunjukkan terdapat perbedaan pada setiap kelompok perlakuan dengan taraf signifikansi  $p < 0,05$ . Sedangkan angka yang diikuti huruf yang sama menunjukkan tidak ada perbedaan pada setiap kelompok perlakuan dengan taraf signifikansi  $p > 0,05$ .

K- = Kontrol negatif (akuades steril)

K+A = Kontrol positif (antibiotik Ampicilin)

K+G = Kontrol positif (glutathion pabrikan)

P1 = Glutathion hasil isolasi dari *S. cerevisiae* konsentrasi 100%

P2 = Glutathion hasil isolasi dari *S. cerevisiae* konsentrasi 75%

P3 = Glutathion hasil isolasi dari *S. cerevisiae* konsentrasi 50%

Penentuan sifat bakteriostatik pada glutathion hasil isolasi dari *S. cerevisiae* dilihat dari tingkat kejernihan yang dihasilkan pada metode dilusi. Hasil pengamatan tingkat kejernihan pada metode dilusi dapat dilihat pada Tabel 2, sedangkan visualisasinya dapat dilihat pada gambar 1.

**Tabel 2.** Rata-Rata Tingkat Kejernihan yang Dihasilkan pada Media NB oleh Koloni Bakteri *P. aeruginosa* dalam Konsentrasi Glutathion hasil isolasi dari *S. cerevisiae*

Kelompok Perlakuan	Tingkat Kejernihan
K-	+++
K+A	-
K+G	-
P1	-
P2	+
P3	++

Keterangan :

- = Jernih
- + = Agak Keruh
- ++ = Keruh
- +++ = Sangat Keruh

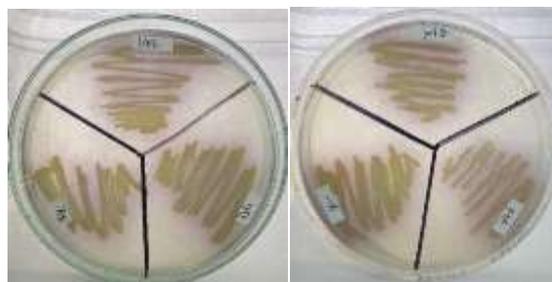
Penentuan sifat bakterisid pada glutathion hasil dari *S. cerevisiae* dapat dilihat dari hasil inokulasi larutan pada masing-masing tabung pada uji kejernihan. Data terkait pertumbuhan hasil uji kejernihan di media MHA (*Muller Hinton Agar*) dapat dilihat pada Tabel 3 dan visualisasinya dapat dilihat pada Gambar 1.

**Tabel 3.** Rata-Rata Pertumbuhan Koloni Bakteri *P. aeruginosa* pada Media MHA (*Muller Hinton Agar*) dalam Konsentrasi Glutathion hasil isolasi dari *S. cerevisiae*

Kelompok Perlakuan	Hasil
K-	+
K+A	+
K+G	+
P1	+
P2	+
P3	+

Keterangan :

- = Tidak ada pertumbuhan
- + = Ada pertumbuhan

**Gambar 1.** Visualisasi Pertumbuhan *P. aeruginosa* dari tabung K- sampai P3 pada Media MHA

Berdasarkan data pada tabel 2 dapat diketahui bahwa tabung yang jernih adalah larutan dengan penambahan glutathion hasil isolasi dari *S. cerevisiae* dengan konsentrasi 100%. Sedangkan berdasarkan tabel 3 dan gambar 1 semua larutan yang ditanam pada media MHA tumbuh koloni *P. aeruginosa*.



Penelitian yang dilakukan oleh Das (2017) memperkuat pernyataan bahwa glutathion memiliki efek antibakteri. Pada penelitian Das tersebut menunjukkan bahwa pemberian glutathion terbukti menurunkan produksi biofilms pada *P. aeruginosa*. Biofilms merupakan kumpulan dari sel-sel bakteri yang melekat pada permukaan sel inang dengan tujuan untuk meningkatkan daya serang (patogenitas) serta mencegah penetrasi dan kerja antibiotik yang diberikan. Penurunan produksi biofilms tersebut karena piosianin yang harusnya berikatan dengan eDNA dari *P. aeruginosa* untuk membentuk matriks biofilms, berikatan dengan glutathion yaitu pada bagian gugus -SH. Ketika eDNA dan piosianin gagal berikatan maka akan mengganggu proses pembentukan dan integritas dari biofilms. Saat proses pembentukan dan integritas biofilms terganggu maka akan menghambat pertumbuhan *P. aeruginosa* pada inang dan menetralkan toksisitas *P. aeruginosa* (Das *et al.*, 2015). Adanya efek antibakteri pada glutathion hasil isolasi dari *S. cerevisiae* dapat menjadi alternatif pengobatan infeksi yang disebabkan oleh infeksi bakteri *P. aeruginosa* yang sangat menguntungkan. Hal tersebut karena mengingat bakteri *P. aeruginosa* bersifat patogen oportunistik sehingga penggunaan glutathion selain sebagai antibakteri juga dapat menjadi antioksidan dan perbaikan imun pasien sehingga mempercepat penyembuhan infeksi.

Keterbatasan dalam penelitian ini adalah senyawa glutathion hasil isolasi dari *S. cerevisiae* belum dilakukan tindakan purifikasi sehingga, masih tercampur dengan media dan bahan yang digunakan. Meskipun belum dilakukan purifikasi dapat dipastikan bahwa adanya aktivitas antibakteri terhadap *P. aeruginosa* dikarenakan senyawa glutathion. Hal tersebut karena kandungan lain seperti media YPD, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, glutamat dan sistein tidak memiliki kemampuan antibakteri untuk menghambat aktivitas pertumbuhan dari *P. aeruginosa*. Saat proses pengukuran kadar glutathion, DTNB yang warna awalnya bening ketika direaksikan dengan larutan ekstraseluler berubah warna menjadi kuning yang menandakan bahwa dalam larutan yang direaksikan dengan DTNB mengandung glutathion. Selain itu, pada uji menggunakan metode dilusi pengamatan hasilnya dilakukan secara visual secara langsung. Sebaiknya jika memungkinkan, pengamatan tingkat kejernihan pada metode dilusi dapat diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer dengan begitu hasil yang diperoleh lebih valid. Namun pada penelitian yang telah dilakukan dengan 5 kali ulangan memperoleh hasil yang sama yaitu konsentrasi yang memiliki kejernihan yang sama dengan kontrol positif adalah konsentrasi 100%.

## **SIMPULAN**

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan dapat disimpulkan bahwa glutathion hasil isolasi dari *S. cerevisiae* memiliki aktivitas antibakteri terhadap *P. aeruginosa* pada konsentrasi 100%. Sehingga, glutathion hasil isolasi dari *S. cerevisiae* dapat digunakan sebagai pengobatan alternatif pada infeksi *P. aeruginosa*.

**DAFTAR PUSTAKA**

- Bachhawat, A. K., Thakur, A., Kaur, J. & Zulkifli, M. (2013). Glutathion Transporters. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1830, 3154-3164.
- Cheluvappa, R., Shimmon, R., Dawson, M., Hilmer, S. N. & Couteur, D. G. L. (2008). Reactions of *P. aeruginosa* Pyocyanin with Reduced Glutathione. *Acta Biochimica Polonica*, 5(3), 571–580.
- Collinson, L. P. & Dawes, I. W. (1992). Inducibility of The Response of yeast Cells To Peroxide Stress. *Jurnal of General Microbiology*, 138, 329-335.
- Das, T., Kutty, S. K., Tavallaie, R., Ibuga, A. I., Panchompoo, J., Sehar, S., Aldos, L., Yeung, A. W. S., Thomas, S. R., Kumar, N., Gooding, J. J. & Manefield, M. (2015). Phenazine Virulence Factor Binding to Extracellular DNA is Important for *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Formation. *Scientific Reports*, 5(8398), 1-9. <https://doi.org/10.1038/srep08398>.
- Das, T., Siomone, M., Ibugo, A. I., Witting, P. K., Manefield, M. & Manos, J. (2017). Glutathione Enhances Antibiotic Efficiency and Effectiveness of DNase I in Disrupting *P. aeruginosa* Biofilms while also Inhibiting Pyocyanin Activity, Thus Facilitating Restoration of Cell Enzymatic Activity, Confluence and Viability. *Frontiers In Mikrobiologi*, 8(2429), 1–18. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02429>.
- Fraternale, A., Brundu, S. & Magnani, M. (2016). Glutathione and Glutathione Derivatives in Immunotherapy. *Biol. Chem*, 1–14. <https://doi.org/10.1515/hsz-2016-0202>.
- Ismail, Y. S., Yulvizar, C., Putriani. (2017). Isolasi, Karakterisasi dan Uji Aktivitas Antimikroba Bakteri Asam Laktat dari Fermentasi Biji Kakao (*Theobroma cacao L.*). *Jurnal Biosehuler*, 1(2), 45-53.
- Kapoor, G., Saigal, S., & Elongavan, A. (2017). Action and Resistance Mechanisms of Antibiotics: A Guide for Clinicians. *Journal of Anaesthesiology Clinical Pharmacology*, 33(3), 300-305. <https://doi.org/10.4103/joacp.JOACP>.
- Lutpiatina, L. (2017). Cemaran *Staphylococcus aureus* dan *Pseudomonas aerogenosa* pada Steteskop di Rumah Sakit. *Jurnal Teknologi Laboratorium*, 6(2), 61–66.
- Megariyanthi, N. P. A., Wirawan, I. G., Suartha, I. N. & Sudimartini, L. M. (2018). Efektivitas Ekstrak Etanol Daun Pegagan Terhadap Bakteri *Micrococcus luteus* Diisolasi dari Dermatitis Kompleks Anjing. *Indonesian Medicus Veterinus*, 7(5), 475-481.
- Mutsaqof, A. A. N., Wiharto & Suryani, E. (2015). Sistem Pakar untuk Mendiagnosis Penyakit Infeksi Menggunakan Forward Chaining. *Jurnal Itsmart*, 4(1), 43–47.
- Rustini, Istiqamah, S. & Armin, F. (2016). Penentuan Multi Drug Resisten *P. aeruginosa* (MDRPA) yang Berasal dari Sampel Klinis Pasien RSUP Dr. Djamil Padang. *Prosiding Rakernas dan Pertemuan Ilmiah Tahunan Ikatan Apoteker Indonesia*. Padang: Universitas Andalas.
- Salasa, A. M., Ratnah, S. & Ibrahim H. I. (2019). Penentuan nilai MIC (Minimum Inhibitory Concentration) dan MKC (Minimum Killing Concentration) Ekstrak Daun Kecombrang (*Etlingera Elatior*) terhadap *Candida albicans* penyebab Keputihan. *Media Farmasi Politekes Makassar*, 17(1),1-5.
- Xiong, Z. Q., Guo, M. J., Guo, Y. X., Chu, J., Zhuang, Y. P. & Zhang, S. L. (2009). Efficient Extraction of Intracellular Reduced Glutathione from Fermentation Broth of *S. cerevisiae* by Ethanol. *Bioresource Technology*, 100, 1011-1014. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.07.018>.
- Yani, Z. & Kangmin, D. (2009). Glutathione Exhibits Antibacterial Activity and Increases Tetracycline Efficacy Against *P. aeruginosa*. *Science in China, Series C: Life Sciences*, 52(6), 501–505. <https://doi.org/10.1007/s11427-009-0074-8>.
- Yuniastuti, A. (2016). *Dasar Molekuler Glutathion dan Perannya sebagai Antioksidan*. Semarang: FMIPA PRESS.