

The *In Vitro* Antibiofilm Activity of Water Leaf Extract of Papaya (*Carica papaya* L.) against *Pseudomonas aeruginosa*

(Aktivitas Antibiofilm Ekstrak Air Daun Pepaya (*Carica papaya* L.) terhadap Bakteri *Pseudomonas aeruginosa* secara *In Vitro*)
Ekajayanti Kining¹, Syamsul Falah^{1*}, Novik Nurhidayat²

¹Department of Biochemistry, Bogor Agricultural University, Bogor, 16680, Indonesia

²Center of Biology Research and Development, Indonesian Institute of Science (LIPI)

Received : 22 June 2015; Accepted: 4 January 2016

Corresponding author: Dr. Syamsul Falah, S.Hut, M.Si; Departemen Biokimia, Jl. Agatis Gd. Fapet Lt. 5, Wing 5, Bogor 16680; Telp/Fax. +62251-8423267; E-mail: syamsulfalah7053@gmail.com

ABSTRACT

Pseudomonas aeruginosa is one of opportunistic pathogen forming bacterial biofilm. The biofilm sustains the bacterial survival and infections. This study aimed to assess the activity of water extract of papaya leaves on inhibition of cells attachment, growth and degradation of the biofilm using crystal violet (CV) biofilm assay. Research results showed that water extract of papaya leaves contains alkaloids, tanins, flavonoids, dan steroids/terpenoids and showed antibacterial activity and antibiofilm against *P. Aeruginosa*. Addition of extract can inhibit the cell attachment and was able to degrade the biofilm of 40.92% and 48.058% respectively at optimum conditions: extract concentration of 25% (v/v), temperature 37.5°C and contact time 45 minutes. With a concentration of 25% (v/v), temperature of 50 °C and the contact time of 3 days, extract of papaya leaves can inhibit the growth of biofilms of 39.837% v/v.

Keywords: antibiofilm, *Carica papaya* L, *Pseudomonas aeruginosa*

ABSTRAK

Pseudomonas aeruginosa merupakan salah satu patogen oportunistik yang membentuk biofilm. *P. aeruginosa* cenderung membentuk biofilm untuk mempertahankan kelangsungan hidupnya saat membentuk koloni pada inang. Penelitian ini bertujuan untuk mengkaji potensi ekstrak air daun pepaya sebagai penghambat perlekatan, penghambat pertumbuhan maupun pendegradasi biofilm dengan metode crystal violet (CV) biofilm assay. Hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstrak daun pepaya yang secara kualitatif mengandung alkaloid, tanin, flavonoid, steroid/terpenoid menunjukkan aktivitas antibakteri dan antibiofilm bakteri *P. aeruginosa*. Ekstrak ini mampu menghambat perlekatan sel dan mampu mendegradasi biofilm berturut-turut sebesar 41.176% dan 49.02% pada

kondisi optimum yaitu dengan konsentrasi 25% v/v, suhu 37.5°C dan waktu kontak 45 menit. Dengan konsentrasi 25% v/v, suhu 50°C dan waktu kontak 3 hari mampu menghambat pertumbuhan biofilm sebesar 46.748% v/v.

Kata kunci: antibiofilm, *Carica papaya* L, *Pseudomonas aeruginosa*

1. PENDAHULUAN

Pseudomonas aeruginosa merupakan patogen oportunistik, yaitu bakteri yang memulai infeksi dengan memanfaatkan kerusakan pada mekanisme pertahanan inang. Bakteri ini dapat menyebabkan infeksi saluran kemih, infeksi saluran pernafasan, dermatitis, infeksi jaringan lunak, infeksi tulang dan sendi, infeksi saluran pencernaan dan bermacam-macam infeksi sistemik, terutama pada penderita luka bakar berat, kanker, dan penderita AIDS yang mengalami penurunan sistem imunitas. Infeksi *P. aeruginosa* menjadi masalah serius pada pasien rumah sakit yang menderita kanker, fibrosis kistik dan luka bakar (Mansouri *et al.* 2013).

Berdasarkan penelitian yang dilakukan di RSUP M. Djamil pada tahun 2000 didapatkan bahwa kuman *Multi Drug Resistant* (MDR) *P. aeruginosa* merupakan bakteri penyebab infeksi nosokomial ketiga setelah *Staphylococcus* dan *E. coli* dengan prevalensi sebesar 11.7% (Rasyid 2011). Di tempat yang sama didapatkan data dari bulan Juli hingga Desember 2012, dari 683 pasien nosokomial, yang mengalami infeksi akibat *P. aeruginosa* sebanyak 80 pasien dimana 27 pasien dari bahan pus, sputum 27 pasien, urin 6 pasien, cairan 8 pasien, swab tenggorokan 8 pasien, dan feses 1 pasien (Putri 2014).

P. aeruginosa cenderung membentuk biofilm untuk mempertahankan kelangsungan hidupnya saat membentuk koloni pada inang.

Biofilm yaitu kumpulan koloni sel-sel mikroba yang menempel pada suatu permukaan misalnya kateter yang dipadatkan (agregat) dalam sebuah matriks cair yang terbentuk dari campuran protein, asam nukleat dan polisakarida berbentuk gel kental di sekeliling bakteri. Biofilm dapat melindungi bakteri dari pertahanan tubuh inang, juga mampu menetralkan pengaruh buruk lingkungan seperti pH ekstrim, tipisnya kandungan oksigen serta tekanan dan suhu yang ekstrim (Karatan dan Watnick 2009). Sel-sel biofilm dapat saling memisahkan diri dan bergabung dengan sistem matriks lainnya. Hal ini menyebabkan sel-sel penyusun biofilm lebih sulit untuk ditekan populasinya dibandingkan dengan bakteri non biofilm.

Pencarian alternatif pengendalian bakteri biofilm khususnya untuk bakteri *P. aeruginosa* saat ini masih terus diupayakan, baik berupa agen bakterisida atau bakteriostatik. Namun selama ini yang digunakan adalah antibiofilm berbahan kimia sintetik yang dapat memberi dampak negatif pada manusia. Sebagian besar produk alam yang berpotensi sebagai antibiofilm diidentifikasi sejauh ini mengandung senyawa terpenoid, steroid, karotenoid, fenolik, furanon, tannin, alkaloid, peptida dan lakton (Viju *et al.* 2013). Pemilihan daun pepaya (*Carica papaya* L.) sebagai sampel penelitian didasarkan penelitian Milind dan Gurdita (2011) yang menunjukkan bahwa daun pepaya mengandung alkaloid karpainin, karpain, vitamin C, E, kolin, enzim proteolitik papain, saponin, flavonoid dan tanin

yang diharapkan dapat menjadi alternatif agen antibiofilm yang dapat mencegah perlekatan sel, pertumbuhan dan/atau dapat mendegradasi biofilm.

Optimasi perlakuan perlu dilakukan untuk memaksimalkan respon. Optimasi dengan metode konvensional membutuhkan waktu yang lama dan relatif mahal. Metode konvensional dalam sekali percobaan, hanya satu variabel yang divariasikan sehingga variabel yang satu dengan variabel yang lain tidak diketahui dengan jelas. Tiap variabel diasumsikan independen satu sama lainnya sehingga perlu dilakukan banyak uji secara bertahap. Oleh karena itu, prosedur optimasi dengan jumlah percobaan yang banyak dapat dilakukan dengan mudah menggunakan *response surface methodology* (RSM) (Saravanakumar *et al.* 2010).

Response surface methodology merupakan suatu model untuk mempelajari faktor yang mempengaruhi respon secara bersamaan tanpa banyak percobaan yang dilakukan. Teknik optimasi dengan menggunakan RSM dilakukan untuk mendapatkan solusi terbaik dari kombinasi variabel seperti konsentrasi ekstrak, suhu, serta waktu kontak. Kelebihan teknik RSM ialah meminimalkan waktu, tenaga dan biaya (Adinarayana dan Ellaiah. 2002).

2. METODOLOGI

Persiapan Sampel Daun dan Ekstraksi (modifikasi Sandasi *et al.* 2009)

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun pepaya (*Carica papaya* L.) yang diambil di sekitar kampus IPB. Determinasi dilakukan di Pusat Konservasi Tumbuhan Kebun Raya LIPI. Sampel daun dicuci dengan air mengalir untuk membersihkan dari tanah

atau kerikil. Selanjutnya dilakukan proses pengeringan dengan cara diangin-anginkan selama kurang lebih 3 hari, selanjutnya dikeringkan dalam oven bersuhu 40°C selama 24 jam. Daun yang telah kering kemudian dihancurkan secara aseptik menggunakan blender. Ekstraksi dilakukan dengan cara sebanyak 5 g daun kering dimaserasi dengan akuades steril 100 mL dan di *shaker* pada suhu ruang selama 18-24 jam. Larutan disaring menggunakan kertas saring kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 10000 rpm selama 5 menit, supernatan kemudian disaring menggunakan *CN membrane filter* 0.2 µm. Sebelum dilakukan pengujian, ekstrak hasil penyaringan diencerkan menggunakan pelarut air dengan variasi konsentrasi 25% v/v, 62.5% v/v dan 100% v/v.

Analisis Fitokimia (Harborne 1987)

Analisis fitokimia dilakukan untuk menentukan komponen bioaktif yang terdapat pada ekstrak daun pepaya yang memiliki aktivitas penghambatan paling besar sebagai antibiofilm. Analisis fitokimia yang dilakukan menggunakan uji tabung yang terdiri dari uji alkaloid, saponin, flavonoid, tanin, triterpenoid dan steroid.

Persiapan Bakteri Uji (Modifikasi Didik 2010)

Mikroba uji yang digunakan adalah bakteri patogen *P. aeruginosa* koleksi Lab. Mikrobiologi Kesehatan LIPI Cibinong. Pada hari pertama, satu ose bakteri diinokulasi ke dalam media heterotrof cair kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C (OD 0.5). Pada hari kedua, suspensi bakteri diinokulasikan ke dalam media padat HTR dengan metode sebar kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Koloni tunggal kemudian diinokulasi ke dalam

media agar *Pseudomonas Isolation Agar* menggunakan jarum ose bulat secara goresan dengan aseptis, kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam.

Uji Aktivitas Antibakteri (Modifikasi Muljadi *et al.* 2013)

Aktivitas antibakteri dilakukan dengan menggunakan Metode Difusi Cakram *Kirby-Bauer*. Kertas cakram steril (6 mm) dimasukkan ke dalam 1 mL ekstrak dan dibiarkan selama 15 menit, selanjutnya dimasukkan ke dalam agar yang telah berisi bakteri uji. Kertas cakram steril yang dimasukkan ke dalam akuades steril digunakan sebagai kontrol negatif dan antibiotik komersil ampisilin sebagai kontrol positif. Kertas cakram tersebut kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Setelah diinkubasi kemudian diamati zona hambatnya. Klasifikasi respon hambatan berdasarkan diameter zona bening bisa dilihat pada Tabel 1.

Uji Penghambatan Perlekatan Sel (Modifikasi Sandasi *et al.* 2009)

Pada tahap awal yang dilakukan adalah melapisi sumur dengan ekstrak. Sebanyak 200 µL ekstrak dengan variasi konsentrasi 25, 62.5, dan 100 % (v/v) dimasukkan ke dalam sumuran. Sumur tanpa penambahan sampel digunakan

sebagai kontrol negatif. *Microplate* kemudian diinkubasi pada suhu 25, 37.5, dan 50°C dengan variasi waktu yaitu 30, 45, dan 60 menit. *Microplate* dicuci dengan air steril sebanyak 3 kali untuk mengeluarkan sisa sampel. Selanjutnya dilakukan pembentukan biofilm dengan cara memasukkan suspensi bakteri 60 µL dan media HTR sebanyak 120 µL pada *microplate* dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 3 hari. *Microplate* dicuci dengan air steril sebanyak 3 kali untuk mengeluarkan suspensi bakteri yang tidak membentuk biofilm. Sebanyak 200 µL kristal violet 1% dimasukkan ke dalam sumur kemudian diinkubasi pada suhu ruang selama 15 menit. *Microplate* dicuci dengan air steril, kemudian ditambahkan etanol absolut 200 µL dan diinkubasi pada suhu ruang selama 15 menit. Pengamatan dilakukan dengan *iMark Bio-Rad microplate reader* pada panjang gelombang 595 nm.

$$\% \text{ PPS} = \frac{OD \text{ kn} - OD \text{ se}}{OD \text{ kn}} \times 100\%$$

PPS = Penghambatan Perlekatan Sel

OD kn = *OD kontrol negatif*

OD se = *OD sampel eksperimental*

Uji Penghambatan Pertumbuhan Biofilm (Modifikasi Yosephine *et al.* 2013)

Ke dalam masing-masing sumuran dimasukkan sebanyak 80 µL larutan sampel dengan seri konsentrasi 25, 62.5, dan 100% (v/v), 80µL media HTR, serta 40 µL suspensi bakteri lalu *microplate* diinkubasi pada 37°C selama 1, 2, dan 3 hari. Kemudian *microplate* dicuci dengan air steril dan langkah selanjutnya seperti pada uji penghambatan perlekatan sel.

Tabel 1 Klasifikasi Respon Hambatan (Greenwood 1995)

Diameter zona bening (mm)	Respon hambatan pertumbuhan
≤ 10	Tidak ada
11 – 15	Lemah
16 – 20	Sedang
> 20	Kuat

Sumber : Harmely *et al.* 2014

$$\% \text{ PPS} = \frac{OD_{kn} - OD_{se}}{OD_{kn}} \times 100\%$$

PPS = Penghambatan Perlekatan Sel

OD_{kn} = OD kontrol negatif

OD_{se} = OD sampel eksperimental

Uji Degradasi Biofilm (Modifikasi Yosephine et al. 2013)

Prosedur pengujian seperti pada uji penghambatan biofilm, tetapi pada awal dilakukan pembentukan biofilm dengan cara memasukkan suspensi bakteri 60 μL dan media HTR sebanyak 120 μL pada sumur *microplate* dan inkubasi pada suhu 37°C selama 3 hari. Setelah terbentuk biofilm, *microplate* dicuci dengan air steril sebanyak 3 kali untuk mengeluarkan suspensi bakteri yang tidak membentuk biofilm. Sebanyak 200 μL larutan uji dengan variasi konsentrasi yaitu 25, 62.5, dan 100% (v/v) dimasukkan pada masing-masing sumur, sumur tanpa penambahan sampel digunakan sebagai kontrol negatif. Selanjutnya diinkubasi pada suhu 25, 37.5 dan 50°C selama 30, 45, dan 60 menit. Kemudian *microplate* dicuci kembali dengan air steril dan langkah selanjutnya seperti pada uji penghambatan perlekatan sel.

$$\% \text{ DB} = \frac{OD_{kn} - OD_{se}}{OD_{kn}} \times 100\%$$

DB = Degradasi Biofilm

OD_{kn} = OD kontrol negatif

OD_{se} = OD sampel eksperimental

Pengamatan dengan Scanning Electron Microscope (Modifikasi Lee et al. 2011)

Bahan *polystyrene* yang sama dengan bahan *microplate* yang digunakan pada uji sebelumnya dipotong persegi dengan ukuran 0.5 mm x 0.5 mm dan ditempatkan di dalam *microplate* dengan 80 μL suspensi sel *P. aeruginosa* yang

telah ditumbuhkan semalam dan media HTR 120 μL . Sel-sel dan potongan *polystyrene* diinkubasi bersama-sama untuk membentuk biofilm pada 37°C selama 3 hari. Setelah biofilm terbentuk, *microplate* dicuci dengan air steril sebanyak 3 kali untuk mengeluarkan suspensi bakteri yang tidak membentuk biofilm. Sebanyak 200 μL larutan uji dengan konsentrasi 25% (v/v) dimasukkan ke dalam sumur berisi potongan *polystyrene*. Potongan *polystyrene* tanpa penambahan larutan uji digunakan sebagai kontrol negatif. Selanjutnya diinkubasi pada suhu 37.5°C selama 45 menit (perlakuan terbaik pada saat optimasi). Potongan *polystyrene* tersebut dipreparasi meliputi tahap fiksasi dan *coating* menggunakan emas. Setelah itu diamati menggunakan *JEOL JSM 5310LV scanning microscope* di Laboratorium Zoologi LIPI Cibinong.

Analisis Statistik

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental yang dilakukan dengan teknik optimasi dengan metode respon permukaan atau *Response Surface Methodology* (RSM) dengan bantuan software MINITAB 16. Tahapan optimasi untuk menentukan kondisi optimumnya dalam meningkatkan respon pencegahan perlekatan, penghambatan pembentukan biofilm dan kemampuan mendegradasi biofilm. Faktor yang dioptimasi adalah konsentrasi ekstrak (X1) (25, 62,5 dan 100% v/v), suhu (X2) (25, 37,5 dan 50°C), dan waktu kontak (X3) (30, 45 dan 60 menit). Variabel tersebut dipilih karena memiliki peran penting pada saat pengaplikasiannya terutama jika sudah masuk ke dalam program pembersihan CIP (*Cleaning In Place*). CIP merupakan proses pembersihan tanpa membongkar. CIP banyak diterapkan untuk proses pembersihan pipa dan *storage tank*. Prinsip

dalam proses CIP antara lain yaitu *time* (waktu total yang dibutuhkan untuk CIP), *temperature* (suhu), *titration* (konsentrasi larutan asam dan basa).

Keluaran (*output*) dari rancangan percobaan program ini adalah sederet kombinasi variabel yang harus dibuat dan diukur tiap responnya. Penentuan kombinasi optimal pada tahap analisis ditentukan berdasarkan hasil respon yang didapat sesuai dengan keinginan dengan pilihan maksimum, minimum, dalam kisaran (*in range*) atau dengan target tertentu. Pada penelitian ini respon yang diinginkan adalah maksimum. Diharapkan ekstrak dengan kombinasi yang ada dapat memberikan respon 100%. Hasil akhir dari tahap analisis berupa kombinasi baru yang ditetapkan berdasarkan sasaran yang telah ditetapkan sebelumnya. Program akan menetapkan beberapa solusi dengan nilai kesukaan (*desirability*) yang berbeda. Semakin tinggi nilai kesukaan (mendekati 1) berarti semakin optimal kombinasi tersebut. Tujuan optimasi bukan untuk memperoleh nilai *desirability* 1.0, namun untuk mencari kondisi terbaik yang mempertemukan semua fungsi tujuan (Raissi & Farzani 2009).

3. HASIL

Kandungan Fitokimia

Hasil uji kualitatif fitokimia ekstrak air daun pepaya (Tabel 2) menunjukkan positif senyawa alkaloid, tanin, steroid dan flavonoid dan negatif untuk senyawa saponin.

Aktivitas Antibakteri

Zona yang terbentuk pada aktivitas antibakteri dengan metode difusi cakram menunjukkan adanya pengaruh ekstrak pepaya kon-

sentrisi 100% terhadap pertumbuhan bakteri *P. aeruginosa* pada inkubasi 24 jam (Tabel 3).

Optimasi Penghambatan Perlekatan Biofilm

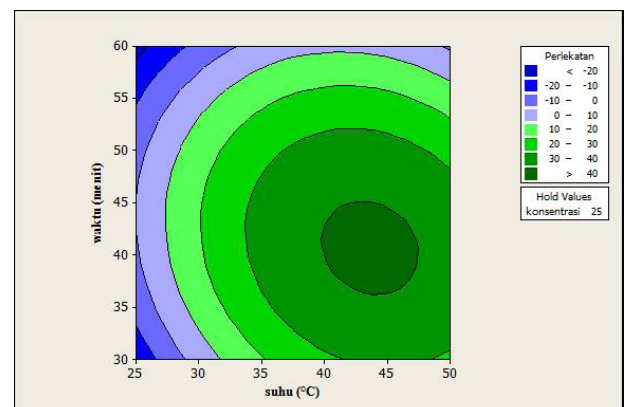
Berdasarkan hasil analisis ANOVA, semua faktor menunjukkan adanya pengaruh secara signifikan ($P < 0.05$) kecuali interaksi konsentrasi dan waktu ($P = 0.113$). Untuk mengetahui korelasi antar faktor dalam model ini terhadap respon penghambatan perlekatan sel

Tabel 2 Hasil uji kualitatif fitokimia ekstrak air daun pepaya (Harborne, 1987)

Senyawa Fitokimia	Hasil Uji
Alkaloid	+
Steroid/ Triterpenoid	+
Tanin	+
Saponin	-
Flavanoid	+

Tabel 3 Diameter zona bening ekstrak pepaya terhadap pertumbuhan bakteri *P. aeruginosa*

Tipe Ekstrak	Diameter zona bening	Respon hambatan pertumbuhan
Kontrol negatif (aquades)	0 mm	Tidak ada
Daun pepaya	25 mm	Kuat
Kontrol positif (ampisilin)	40 mm	Kuat



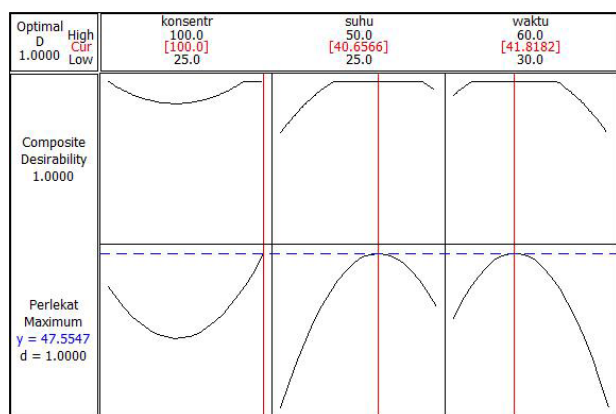
Gambar 1 *Contour plot* hubungan suhu dan waktu kontak terhadap respon penghambatan perlekatan sel

dapat dilihat pada *contour plot* (Gambar 1). Melalui *Contour plot* tersebut dapat diketahui bahwa untuk menghasilkan respon terbaik (>40%) berada pada suhu diantara 35 dan 50°C dan waktu kontak antara 35 dan 50 menit. Berdasarkan penelitian persen penghambatan perlekatan yang paling besar yaitu sebesar 41.176% pada konsentrasi 25% v/v, suhu 37.5°C dengan waktu kontak 45 menit.

Hasil output program *Respon Optimizer* didapatkan optimal *setting* untuk respon pencegahan perlekatan sesuai dengan range yang dipilih seperti pada Gambar 2 terlihat bahwa optimal *setting* untuk kombinasi perlakuan konsentrasi ekstrak, suhu dan waktu kontak berdasarkan range yang kita pilih menghasilkan optimal *desirability* sebesar 1. Kombinasi variabel baru yang disarankan yaitu konsentrasi ekstrak 100% (v/v) dengan suhu 40.6566°C dan waktu kontak 41.8182 menit, respon pencegahan perlekatan dapat ditingkatkan semaksimal mungkin yaitu sebesar 47.5547%.

Optimasi Penghambatan Pertumbuhan Biofilm

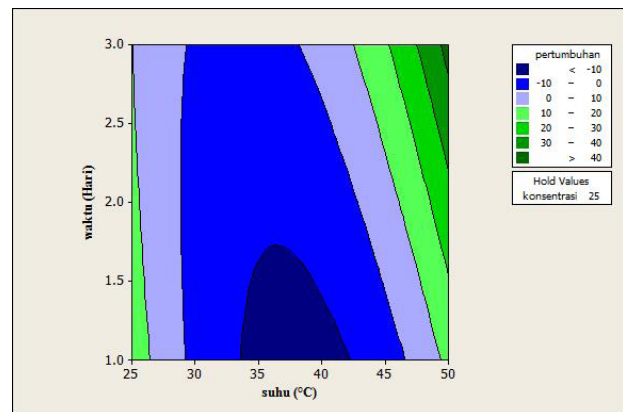
Berdasarkan hasil analisis ANOVA, faktor yang berpengaruh secara signifikan adalah



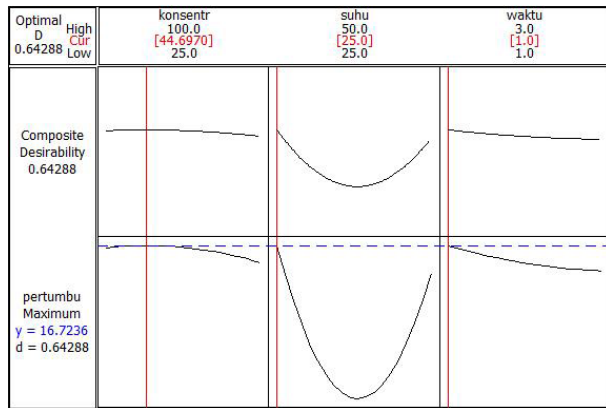
Gambar 2 Optimalisasi pencegahan perlekatan menggunakan *response optimizer*

suhu dimana $P < 0.05$ ($P = 0.000$) dan interaksi antara suhu dan waktu kontak dimana $P < 0.05$ ($P = 0.000$). Untuk mengetahui korelasi antar faktor dalam model ini terhadap respon penghambatan pertumbuhan dapat dilihat pada *contour plot* (Gambar 3). Melalui *Contour plot* tersebut dapat diketahui bahwa untuk menghasilkan respon terbaik (>40%) berada pada suhu diantara 45°C dan 50°C dan waktu kontak antara 2.5 dan 3 hari. Berdasarkan penelitian persen penghambatan pertumbuhan yang paling besar yaitu sebesar 46.748% pada konsentrasi 25% v/v, suhu 50°C dengan waktu kontak 3 hari.

Untuk mendapatkan optimal *setting* dengan harapan perlakuan yang kita lakukan akan menghasilkan respon yang sesuai dengan harapan, dapat diperoleh dari hasil analisis *response optimizer* (Gambar 4). Terlihat bahwa optimal *setting* untuk kombinasi perlakuan konsentrasi ekstrak, suhu dan waktu kontak menghasilkan optimal *desirability* sebesar 0.6. Dengan kombinasi yang disarankan yakni konsentrasi ekstrak 44.70% (v/v) dengan suhu 25°C dan waktu kontak 1 hari, persentase kemampuan degradasi dapat ditingkatkan menjadi semaksimal mungkin 64.29%.



Gambar 3 *Contour plot* hubungan suhu dan waktu kontak terhadap respon penghambatan pertumbuhan biofilm

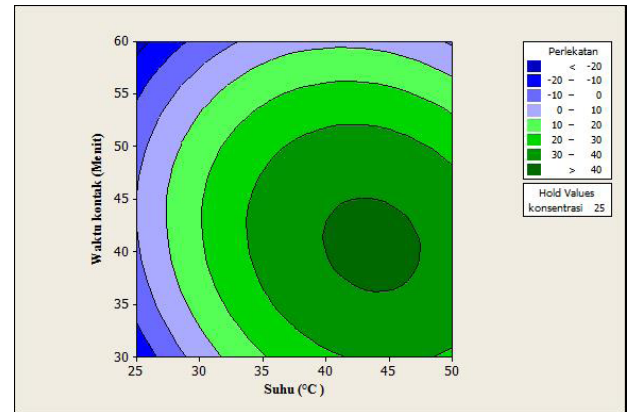


Gambar 4 Optimalisasi kemampuan degradasi menggunakan *response optimizer*

Optimasi Degradasi Biofilm

Berdasarkan hasil analisis ANOVA, faktor yang menunjukkan adanya pengaruh secara signifikan ($P < 0.05$) adalah suhu ($P = 0.000$), waktu kontak ($P = 0.001$), interaksi suhu dan waktu kontak ($P = 0.001$), sedangkan faktor konsentrasi ekstrak ($P=0.240$) dan interaksi konsentrasi dan suhu ($P = 0.325$) tidak berpengaruh secara signifikan. Untuk mengetahui korelasi antar faktor dalam model ini terhadap respon kemampuan degradasi dapat dilihat pada *contour plot* (Gambar 5). Melalui *Contour plot* tersebut dapat diketahui bahwa untuk menghasilkan respon terbaik ($>40\%$) berada pada suhu diantara 35°C dan 50°C dengan waktu kontak antara 35 menit dan 45 menit. Berdasarkan penelitian persen degradasi yang paling besar yaitu sebesar 49.029% pada suhu 37.5°C , waktu kontak 45 menit dengan konsentrasi 25% v/v.

Untuk mendapatkan optimal *setting* dengan harapan perlakuan yang kita lakukan akan menghasilkan respon yang sesuai dengan harapan, dapat diperoleh dari hasil analisis *response optimizer* (Gambar 6). Terlihat bahwa optimal setting untuk kombinasi perlakuan konsentrasi ekstrak, suhu dan waktu kontak menghasilkan

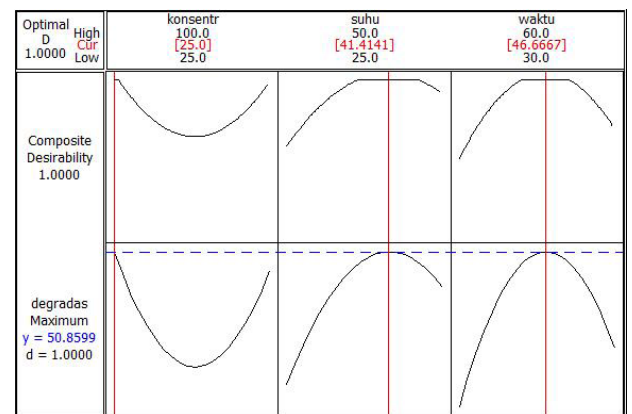


Gambar 5 *Contour plot* hubungan suhu dan waktu kontak terhadap respon degradasi biofilm

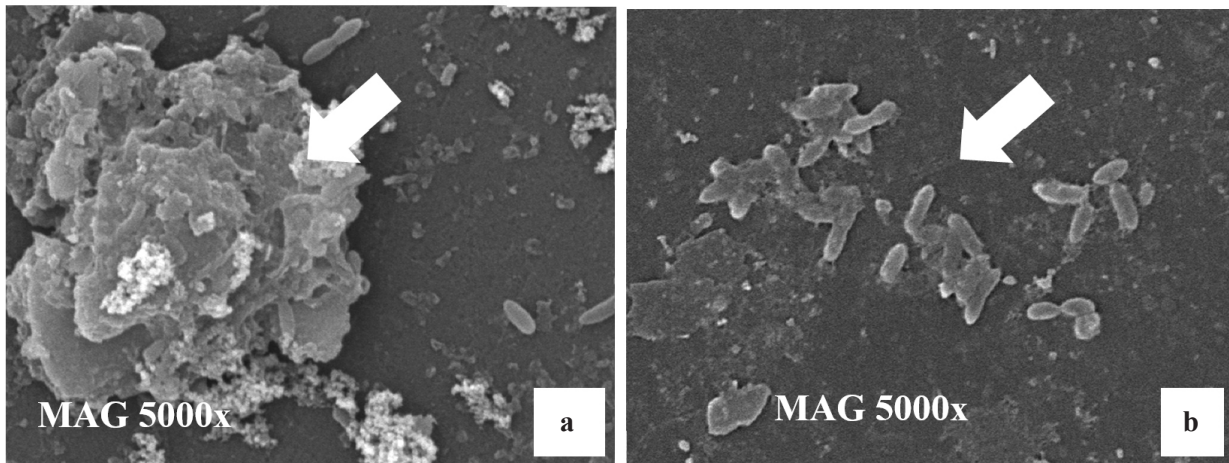
optimal *desirability* sebesar 1.0. Dengan kombinasi yang disarankan yakni konsentrasi ekstrak 25% (v/v) dengan suhu 41.41°C dan waktu kontak 46.67 menit, persentase kemampuan degradasi dapat ditingkatkan menjadi semaksimal mungkin 50.86% .

Pengamatan *Scanning Electron Microscopy* (SEM)

Tujuan dari uji menggunakan SEM ini adalah untuk membuktikan atau memvisualisasikan hasil uji kemampuan degradasi ekstrak pepaya sebelumnya. Perbedaan antara matriks



Gambar 6 Optimalisasi kemampuan degradasi menggunakan *response optimizer*



Gambar 7 Pengamatan kemampuan ekstrak pepaya dalam menghancurkan matriks biofilm *P. aeruginosa*. (a) tanpa perlakuan (b) pemberian ekstrak pepaya 25% (v/v) menggunakan SEM dengan perbesaran 5000x

biofilm yang telah diberikan perlakuan ekstrak daun pepaya dengan biofilm tanpa perlakuan ekstrak terlihat dari hasil SEM dengan perbesaran 5000x pada Gambar 7.

4. PEMBAHASAN

Senyawa Fitokimia

Pada penelitian ini, daun pepaya diekstrak menggunakan pelarut air karena diharapkan senyawa yang terekstrak adalah senyawa yang bersifat polar yang dapat larut dalam air. Air adalah pelarut yang paling sering dan paling baik digunakan dalam proses pembersihan. Hasil uji kualitatif fitokimia ekstrak daun pepaya (Tabel 2) menunjukkan uji positif terhadap senyawa alkaloid, tanin, steroid dan flavanoid. Hasil penelitian ini berbeda dengan uji fitokimia yang dilakukan oleh Yusha'u *et al.* (2009) yang menyatakan bahwa ekstrak air daun pepaya hanya positif mengandung saponin dan tanin. Hal ini menunjukkan bahwa faktor lingkungan seperti iklim, cahaya matahari, suhu udara, lingkungan atmosfer (CO_2 , O_2 , dan kelembaban), lingkungan perakaran (sifat kimia dan fisika

tanah), dan ketersediaan air di dalam tanah memiliki pengaruh terhadap hasil metabolisme sekunder tanaman (Nitisapto dan Siradz 2005). Pengujian tanin menunjukkan bahwa tanin yang terkandung di dalam daun pepaya merupakan tanin kondensasi karena terbentuk warna hijau kehitaman setelah penambahan FeCl_3 . Pada uji alkaloid diperkirakan nitrogen pada alkaloid akan membentuk ikatan kovalen koordinat dengan ion logam K^+ dari kalium tetraiodomerkurat (II) membentuk kompleks kalium-alkaloid yang mengendap (Marlina 2005). Alkaloid yang terkandung dalam pepaya adalah jenis alkaloid karpain ($\text{C}_{14}\text{H}_{25}\text{NO}_2$) (Krishna *et al.* 2008). Hasil positif steroid ditunjukkan dengan terjadinya perubahan warna menjadi hijau biru. Reaksi yang terjadi antara steroid dengan asam asetat adalah reaksi asetilasi gugus $-\text{OH}$ pada steroid yang akan menghasilkan kompleks asetil steroid. Uji flavonoid menunjukkan uji positif (merah) untuk ekstrak daun pepaya. Daun pepaya mengandung senyawa flavonoid glikosida yaitu kuersetin dan kaempferol (Canini *et al.* 2007).

Aktivitas Antibakteri

Hasil pengujian aktivitas antibakteri dari ekstrak daun pepaya (Tabel 3) menunjukkan bahwa daun pepaya memiliki aktivitas antibakteri terhadap bakteri *P. aeruginosa* dengan respon hambat yang kuat (25 mm), meskipun masih lebih kecil bila dibandingkan dengan kontrol positif berupa antibiotik ampisilin yang respon hambatnya kuat (40 mm).

Kontrol positif yang digunakan adalah antibiotik ampisilin yaitu derivat penisilin semi sintetik yang bersifat bakterisida. Menurut Volk dan Wheeler (1993) dalam Saputra (2012), mekanisme kerja penisilin adalah dengan mengganggu sintesis dinding sel, khususnya ketika proses transpeptidasi pada sintesis peptidoglikan dinding sel. Pada proses ini, penisilin memiliki struktur yang sama dengan struktur D-alanil-D-alanin terminal pada peptidoglikan, sehingga enzim transpeptidase bereaksi dengan penisilin. Hal ini membuat struktur peptidoglikan yang dibentuk menjadi tidak sempurna dan melemahkan kekuatan dinding sel pada bakteri.

Berdasarkan hasil uji fitokimia yang telah dilakukan, daun pepaya mengandung senyawa alkaloid, tanin, steroid, dan flavonoid. Menurut Juliantina (2008), senyawa alkaloid memiliki mekanisme penghambatan yang hampir sama dengan ampisilin, yaitu dengan cara mengganggu komponen penyusun peptidoglikan pada sel bakteri, sehingga lapisan dinding sel tidak terbentuk secara utuh dan menyebabkan kematian sel tersebut. Hal tersebut diperkuat oleh pernyataan Gunawan (2009), bahwa di dalam senyawa alkaloid terdapat gugus basa yang mengandung nitrogen dan akan bereaksi dengan senyawa asam amino yang menyusun dinding sel bakteri dan DNA bakteri. Reaksi ini mengakibatkan terjadinya perubahan struktur

dan susunan asam amino yang akan menimbulkan perubahan keseimbangan genetik pada rantai DNA sehingga mengalami kerusakan yang mendorong terjadinya lisis sel bakteri dan menyebabkan kematian sel. Selain itu, kandungan senyawa steroid dapat menghambat pertumbuhan bakteri dengan mekanisme penghambatan terhadap sintesis protein dan menyebabkan perubahan komponen-komponen penyusun sel bakteri itu sendiri (Rosyidah *et al.* 2010). Kuersetin memiliki aktivitas antibakteri yang baik karena adanya gugus fenol yang dapat membentuk ikatan kompleks dengan protein pada membran (protein-fenol), sehingga menyebabkan permeabilitasnya turun. Ikatan kompleks yang telah terbentuk kemudian terurai dan berpenetrasi ke dalam sel sehingga terjadi koagulasi protein dan menyebabkan enzim bakteri tidak aktif. Akibatnya dinding sel bakteri tidak terbentuk dengan baik sehingga terjadi kebocoran sel dan bakteri mati (Juliantina 2008).

Penghambatan Perlekatan Biofilm Ekstrak Daun pepaya

Proses penempelan sel pada permukaan merupakan tahapan pembentukan biofilm yang sangat penting, karena merupakan awal mula dari pembentukan biofilm. Ada beberapa cara yang dapat ditempuh untuk menghambat proses penempelan sel. Salah satunya, tahapan awal dari proses penempelan sel biofilm tergantung pada kondisi permukaan yang menciptakan lingkungan yang menguntungkan bagi penempelan sel (Sandasi *et al.* 2009). Kondisi permukaan dicapai dengan adsorpsi zat termasuk nutrisi, molekul organik dan anorganik yang penting untuk pertumbuhan sel-sel, yang pada akhirnya mempercepat penempelan sel. Oleh karena itu dapat dikendalikan melalui *pretreatment* permu-

kaan dengan ekstrak tumbuh-tumbuhan yang tidak menguntungkan bagi sel, dengan demikian mengurangi penempelan sel pada permukaan. Adanya ekstrak tanaman yang dapat menghambat proses penempelan sel lebih mudah diatasi daripada menghambat pertumbuhan biofilm yang sudah terbentuk (Cerca *et al.* 2005).

Tanin dan flavonoid merupakan senyawa yang terkandung dalam daun pepaya. Berdasarkan penelitian Agnol *et al* (2003) dan Jagani *et al* (2008), tanin dan flavonoid bekerja dengan mengikat salah satu protein adhesin bakteri yang dipakai sebagai reseptor permukaan bakteri, sehingga terjadi penurunan daya perlekatan bakteri serta penghambatan sintesis protein untuk pembentukan dinding sel. Daya hambat pembentukan biofilm oleh zat aktif tanin dan flavonoid juga ditunjukkan pada penelitian Sunanto (2012), dimana zat ini terkandung dalam ekstrak daun dewandaru dan mempunyai *Minimum Biofilm Inhibitory Concentration* (MBIC) sebesar 0.015 g/dL.

Penghambatan Pertumbuhan Biofilm Ekstrak Daun pepaya

Akumulasi biofilm pada permukaan padat terjadi berdasarkan dua tahap. Tahap pertama yaitu pertumbuhan sel dan pembentukan *Extracellular Polymeric Substances* (EPS), sehingga sel biofilm terakumulasi. Tahap kedua adalah bisa terjadi pelepasan atau penempelan kembali. Bakteri menggunakan berbagai organ- el ekstraseluler dan protein untuk penginderaan dan menempel ke permukaan, termasuk flagel pili, fimbriae, serat curli, dan protein luar membran (Thomas *et al.* 2004). Oleh sebab itu, yang menjadi perhatian untuk mencegah pertumbuhan biofilm adalah menghambat atau bahkan mematikan sel agar tidak bertambah, dan

mencegah pembentukan EPS. Ekstrak pepaya seperti yang telah di paparkan sebelumnya positif mengandung senyawa yang memiliki potensi sebagai antibakteri yaitu alkaloid, tanin, steroid dan flavonoid. Zat aktif tersebut diduga memiliki peran penting dalam pencegahan pertumbuhan biofilm.

Selain memiliki aktivitas sebagai antibakteri, Lee *et al* (2013) menyatakan bahwa tanin dan flavonoid juga berpotensi menghambat pertumbuhan biofilm karena dapat menghambat *intercellular adhesion* genes *icaA* dan *icaD*. Gen ini dapat mensintesis *Polysaccharide Intercellular Adhesion* (PIA) yang mempunyai peranan penting dalam agregasi sel dan pembentukan EPS dalam pembentukan biofilm pada bakteri *Staphylococcus aureus* (Archer *et al.* 2011). Oleh sebab itu dengan adanya kandungan tanin dan flavonoid dalam ekstrak pepaya diduga dapat menghambat pertumbuhan biofilm melalui aktivitasnya sebagai antibakteri dan kemampuannya menghambat pembentukan EPS dengan menghambat pembentukan gen penyandi PIA.

Degradasi Biofilm Ekstrak Daun pepaya

Ketika tahap perkembangan biofilm tidak dihambat, maka biofilm yang terbentuk semakin banyak dan membentuk struktur tiga dimensi yang mengandung sel-sel terselubung dalam beberapa kelompok yang saling terhubung satu sama lainnya. Sel-sel dalam biofilm “dilem” oleh EPS, yang menolak stres mekanik dan pelepasan koloni dari permukaan substrat (Renner and Weibel 2011). Kemampuan degradasi biofilm dari suatu senyawa terkait dengan kemampuan penetrasi senyawa tersebut ke dalam biofilm yang terbentuk, yakni mampu berpenetrasi pada lapisan *Extracellular Poly-*

meric Substance (EPS) atau lapisan lendir yang menyelubungi bakteri. Selain itu, kemampuan senyawa dalam mendegradasi biofilm adalah menghilangkan EPS pada biofilm yang sudah terbentuk (Ardani *et al.* 2010).

Enzim telah terbukti efektif untuk degradasi EPS biofilm. Enzim menghapus biofilm langsung dengan mekanisme menghancurkan integritas fisik EPS dengan cara melemahkan struktur protein, karbohidrat dan lemak yakni mengikat dan terjadinya hidrolisis molekul protein dan mengubahnya menjadi unit yang lebih kecil yang dapat diangkut melalui sel membran dan kemudian dapat dimetabolisme. Batang, daun, dan buah pepaya muda mengandung getah berwarna putih yang mengandung suatu enzim pemecah protein atau enzim proteolitik yang disebut papain. Papain merupakan enzim proteolitik, yaitu enzim yang dapat mengurai dan memecah protein (Moehd 1999) dalam Hutabarat (2015). Enzim yang terkandung dalam daun pepaya inilah yang diduga berperan penting dalam mendegradasi lapisan EPS pada biofilm yang terbentuk.

Ekstrak air daun pepaya yang diketahui selain mengandung enzim *protease* juga mengandung metabolit sekunder yang berpotensi sebagai antibiofilm. Carlo *et al.* (1999) dan Estrela *et al.* (1995) dalam Sabir (2005) menyatakan bahwa gugus hidroksil yang terdapat pada struktur senyawa flavonoid membentuk senyawa kompleks dengan protein melalui ikatan hidrogen sehingga menyebabkan perubahan struktur protein dan asam nukleat. Perubahan struktur tersebut dapat menyebabkan protein penyusun EPS terdenaturasi, sehingga daun pepaya merupakan alternatif yang paling direkomendasikan sebagai antibiofilm dalam hal ini untuk mendegradasi biofilm.

Scanning Electron Microscopy (SEM)

Visualisasi menggunakan SEM dapat dikonfirmasi bahwa ekstrak daun pepaya dengan konsentrasi 25% v/v efektif dalam mendegradasi EPS pada biofilm bakteri *P. aeruginosa* (Gambar 11). Dari hasil pengamatan (Gambar 7), terlihat bahwa biofilm yang mendapat perlakuan ekstrak pepaya lebih bersih atau dalam hal ini matriksnya lebih sedikit bahkan tidak ada sama sekali bila dibandingkan dengan biofilm tanpa perlakuan. Hal ini menunjukkan bahwa ekstrak pepaya terbukti dapat mendegradasi matriks biofilm.

5. KESIMPULAN

Berdasarkan pembahasan di atas dapat ditarik kesimpulan bahwa ekstrak daun pepaya yang secara kualitatif mengandung alkaloid, tannin, steroid, dan flavonoid menunjukkan aktivitas antibakteri dengan respon hambatan yang kuat, mampu menghambat perlekatan sel sebesar 41.176% pada konsentrasi 25%, suhu 37.5°C dengan waktu kontak 45 menit, menghambat pertumbuhan biofilm sebesar 46.748% pada konsentrasi 25% v/v, suhu 50°C dengan waktu kontak 3 hari dan mampu mendegradasi biofilm sebesar 49.02% pada suhu 37.5°C, waktu kontak 45 menit dengan konsentrasi 25% (v/v).

6. DAFTAR PUSTAKA

- Adinarayana K, Ellaiah P. 2002. Response surface optimization of the critical medium components for the production of alkaline protease by a newly isolated *Bacillus* sp. *J Pharm Sci Tech.* 5(3) : 272-278.
- Agnol RD, Ferraz A, Bernardi AP, Albring D, Nor C, Sarmiento L, Lamb L. 2003. *Antimicrobial Activity of Some Hypericum species*. Brazil: TANAC SA.

- Archer NK, Mazaitis MJ, Costerton JW, Leid JG, Powers ME, Shirtliff ME. 2011. *Staphylococcus aureus* biofilms properties, regulation and roles in human disease. *Landes Bioscience*. Virulence 2 (5): 445-459.
- Ardani M, Pratiwi, SUT, Hertiani T. 2010. Efek campuran minyak atsiri daun cengkeh dan kulit batang kayu manis sebagai antiplak gigi, *Majalah Farmasi Indonesia*. 21(3): 191-200.
- Canini A, Alesiani D, Giuseppe D, Tagliatesta P. 2007. Gas chromatography–mass spectrometry analysis of phenolic compounds from *Carica papaya* L. leaf. *J Food Composit Analys*. 20 (7): 584–590.
- Cerca N, Martins S, Pier GB, Oliveira R, Azeredo J. 2005. The relationship between inhibition of bacterial adhesion to a solid surface by sub-MICs of antibiotics and subsequent development of a biofilm. *Res Microbiol* 156: 650–655.
- Didik Wahyudi. 2010. Penghambatan Quorum Sensing pada *Pseudomonas aeruginosa* oleh Ekstrak Alpinia galanga l [Tesis]. Surakarta (ID). Universitas Sebelas Maret
- Gunawan, IWA. 2009. Potensi buah pare (*Momordica charantia* l) sebagai antibakteri *Salmonella typhimurium*. Universitas Mahasaraswati Denpasar.
- Harborne, JB. 1987. *Metode Fitokimia: Penuntun Cara Modern Menganalisis Tumbuhan*. Bandung: Institut Teknologi Bandung (diterjemahkan oleh Kosasih Padmawinata dan Iwang Soediro).
- Harmely F, Wilda, Aldi Y. 2014. Formulasi gel ekstrak propolis dari sarang lebah trigona itama (*cockrell*) dan aktivitas antibakteri terhadap *Staphylococcus epidermidis*. *Prosiding Seminar Nasional dan Workshop “Perkembangan Terkini Sains Farmasi dan Klinik IV”*.
- Jagani S, Chelikani R, Kim D. 2008. Effect of phenol and natural phenolic compounds on biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa*. *Biofouling* 25 (4): 321-324
- Juliantina FR. 2008. Manfaat sirih merah (*Piper crocatum*) sebagai agen anti bakterial terhadap bakteri gram positif dan gram negatif. *JKKI*. 1(3): 5-8.
- Karatan E, Watnick P. 2009. Signals, regulatory networks, and materials that build and break bacterial biofilms. *Microbiol Molec Biol Rev*. 73: 310-347
- Krishna KL, Paridhavi M, Jagruti AP. 2008. Review on nutritional, medicinal and pharmacological properties of Papaya (*Carica papaya* Linn.). *Nat Prod Rad*. 7(4): 364-373.
- Lee JH, Cho MH, Lee J. 2011. 3-Indolylacetonitrile decreases *Escherichia coli* O157:H7 biofilm formation and *Pseudomonas aeruginosa* virulence. *Environ Microbiol*.13(1): 62–73
- Lee JH, Park JH, Cho HS, Joo SW, Cho MH, Lee J. 2013. Anti-biofilm activities of quercetin and tannic acid against *Staphylococcus aureus*. *Biofouling*. 29(5):491-499
- Mansouri S, Safa A, Najar SG, Najar AG. 2013. Inhibitory activity of Iranian plant extracts on growth and biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa*. *Malay J Microbiol*. 9(2). 176-183
- Milind P, Gurditta. 2011. Basketful Benefits of Papaya. *IRJP*, 2(7): 6-12.
- Mulyadi M, Wuryanti, Purbowatiningrum RS. 2013. Konsentrasi hambat minimum (KHM) kadar sampel Alang-alang (*Imperata cylindrical*) dalam etanol melalui metode difusi cakram. *Chem Info*. 1(1): 35-42
- Nitisapto M, Siradz SA. 2005. Evaluasi kesesuaian lahan untuk pengembangan jahe pada beberapa daerah di Jawa Tengah dan Jawa Timur. *J Tanah Lingk*, 5(2): 15-19.
- Putri AA. 2014. Perbedaan sensitivitas kuman *Pa* penyebab infeksi nosokomial terhadap antibiotika generik dan antibiotika paten [skripsi] Padang (ID): Unand.
- Rasyid R. 2011. Karakteristik kuman MDR-*Pseudomonas aeruginosa* penyebab infeksi nosokomial dengan menggunakan pulsed field gel electrophoresis (PFGE). Program Hibah

- Kompetisi Peningkatan Kualitas Pendidikan Dokter (PHK PKPD). Universitas Andalas.
- Rosyidah K, Nurmuhaimina, Komari MD, Astuti. 2010. Aktivitas antibakteri fraksi saponin dari kulit batang tumbuhan Kasturi mangi- vera. *Bioscientiae*, 7 (2): 25-31.
- Sandasi M, Leonard CM, Viljoen AM. 2009. The in- vitro antibiofilm activity of selected culinary herbs and medicinal plants against *Kisteris monocytogenes*. *Lett Appl Microbiol*. 50: 30-35.
- Saputra A. 2012. Aktivitas penisilin dari *Penicillium chrysogenum* pada substrat air lindi dengan variasi kadar molase dan waktu inkubasi [Skripsi]. Yogyakarta: Universitas Atma Jaya Yogyakarta
- Saravanakumar K, Baskaran R, Kubendran TR. 2010. Acoustic and thermodynamic properties of binary liquid mixtures of acetophenone and benzene. *J Appl Sci*. 10: 1616-1621.
- Sunanto EH. 2012. Efek ekstrak daun dewandaru (*Eugenis uniflora*) sebagai penghambat pembentukan biofilm pada *Staphylococcus aureus* secara in vitro [Skripsi]. Malang: Universitas Brawijaya.
- Viju N, Satheesh S, Vincent, SGP. 2013. Antibiofilm activity of coconut (*Cocos nucifera* Linn.) husk fibre extract. *Saudi J Biol Sci*. 20: 85–91.
- Yosephine AD, Wulanjati MP, Saifullah TN, Astuti P. 2013. Formulasi mouthwash minyak atsiri daun kemangi (*Ocimum basilicum* L.) serta uji antibakteri dan antibiofilm terhadap bakteri *Streptococcus mutans* secara in vitro. *Trad. Med. J*, 18(2): 95-102.
- Yusha’u M, Onuorah FC, Murtala Y. 2009. In vitro sensitivity pattern of some urinary tract isolates to *Carica papaya* extracts. *BaJoPAS*. 2(2): 75–78.