

AKTIVITAS ANTIBAKTERI GETAH PEPAYA KERING TERHADAP *Staphylococcus aureus* PADA DANGKE

[Antibacterial Activity of Dried Papaya Latex toward *Staphylococcus aureus* in Dangke]

Rifah Hestyani Arum¹⁾, Budiartman Satiawihardja^{1,2)} dan Harsi D. Kusumaningrum^{1,2,3)*}

¹⁾ Program Studi Ilmu Pangan, Institut Pertanian Bogor, Bogor

²⁾ Departemen Ilmu dan Teknologi Pangan, Fakultas Teknologi Pertanian, Institut Pertanian Bogor, Bogor

³⁾ Southeast Asian Food and Agricultural Science and Technology (SEAFST) Center, Bogor

Diterima 19 November 2013 / Disetujui 12 Mei 2014

ABSTRACT

Dangke is a traditional milk curd product, made by coagulation of milk using fresh papaya latex. This product is usually kept at room temperature (27-30°C) until consumption. Dried papaya latex was used in this study to produce dangke, and its effect to *S. aureus* was determined by direct contact in TSB and dangke. Fresh papaya latex was dried using vacuum oven at 50-55°C for 22 hours. Dried papaya latex at a concentration of 2.7×10^{-3} g/100 mL could reduce *S. aureus* approximately 1 log CFU/mL in TSB after 24 hours. Dried papaya latex and papain could maintain the *S. aureus* number in dangke within 24 hours storage at room temperature. The antibacterial activity of non-proteolytic compound of papaya latex, i.e. ethanolic extract of papaya latex was determined by macrodilution method, resulted in the MIC₉₀ of 8 mg/mL. The cell membrane leakage after exposure was detected by measuring the optical density of bacterial supernatant at 260 nm. The result showed that exposure to increasing antibacterial concentration resulted in increasing of optical density of *S. aureus* supernatant, indicating that the antibacterial caused the *S. aureus* membrane leakage. Fluorescence microscopy imaging showed that *S. aureus* exposure to antibacterial caused membrane leakage thus gave Propidium Iodide (PI) chance to penetrate into the cell, as indicated by changing of fluorescence color from green to red.

Keywords: cell membrane leakage, dangke, dried papaya latex

ABSTRAK

Dangke merupakan produk *curd* susu tradisional yang dibuat melalui proses koagulasi susu menggunakan getah pepaya. Produk ini biasanya disimpan pada suhu ruang (27-30°C) hingga akan dikonsumsi dan mampu bertahan selama kurang lebih 24 jam. Getah pepaya pada penelitian ini digunakan untuk membuat dangke dan efeknya terhadap *S. aureus* ditentukan dengan menggunakan metode kontak pada media *Trypticase Soy Broth* (TSB) dan dangke. Getah pepaya segar dikeringkan dengan menggunakan oven vakum pada suhu 50-55°C selama 22 jam. Getah pepaya kering dengan konsentrasi 2.7×10^{-3} g/100 mL mampu menurunkan jumlah *S. aureus* sebanyak 1 log CFU/mL setelah 24 jam. Getah pepaya kering dan papain menunjukkan kemampuan mempertahankan jumlah *S. aureus* pada dangke selama penyimpanan 24 jam pada suhu ruang. Aktivitas antibakteri komponen non-proteolitik dari getah pepaya, seperti ekstrak etanol getah pepaya ditentukan dengan menggunakan metode *macrodilution*, diperoleh nilai KHM₉₀ sebesar 8 mg/mL. Kebocoran membran sel setelah pemaparan dengan antibakteri dideteksi dengan mengukur absorbansi supernatan *S. aureus* pada panjang gelombang 260 nm. Hasil yang diperoleh menunjukkan peningkatan konsentrasi antibakteri mengakibatkan peningkatan absorbansi supernatan yang mengindikasikan antibakteri mampu mengakibatkan kebocoran pada membran *S. aureus*. Pengamatan dengan menggunakan mikroskop fluoresensi memperlihatkan terjadi perubahan warna fluoresensi yang dihasilkan oleh *S. aureus* akibat masuknya *propidium iodida* (PI) ke dalam sel melalui membran yang bocor akibat aktivitas antibakteri.

Kata kunci: dangke, getah pepaya kering, kebocoran membran sel

PENDAHULUAN

Dangke merupakan salah satu produk pangan tradisional yang berasal dari daerah Enrekang, Sulawesi Selatan yang mirip dengan tahu susu. Dangke dibuat dengan menggunakan susu menggunakan getah pepaya, yang mengakibatkan perubahan konformasi pada struktur tiga dimensi protein karena aktivitas proteolitiknya (Geantaresa *et al.* 2010). Dangke yang disimpan pada suhu ruang (27-30°C) berpotensi dapat terkontaminasi oleh *S. aureus*, mengingat susu pasteurisasi

sebagai bahan baku dangke dapat terkontaminasi oleh *S. aureus* dengan jumlah rata-rata 3.5×10^3 CFU/mL sebagaimana dilaporkan oleh De Olivevera *et al.* (2011).

Getah pepaya yang digunakan pada pembuatan dangke, selain memiliki aktivitas proteolitik juga dilaporkan memiliki kemampuan sebagai bahan antibakteri dan anti-inflamasi (Ashok *et al.* 2011; Aravind *et al.* 2013). Aktivitas antibakteri getah pepaya dan papain dari getah pepaya telah dilaporkan oleh Seenivasan *et al.* (2010) yang menguji aktivitas antibakteri papain terhadap beberapa bakteri dan fungi pada media *Mueller Hinton Agar* (MHA). Selain itu, ekstrak petroleum eter dan metanol getah pepaya juga menunjukkan kemampuan menghambat pertumbuhan *E. coli*, *S. aureus*, dan *P. aeruginosa*

*Penulis Korespondensi:
E-mail: h_kusumaningrum@ipb.ac.id; Telp: 0251-8626725

(Ashok *et al.* 2011). Pengujian aktivitas antibakteri getah tanaman selama ini banyak dilakukan pada media MHA (Aref *et al.* 2010; Arekemase *et al.* 2011). Pada penelitian ini selain dilakukan pengujian sifat antimikroba getah pepaya pada media pertumbuhan juga dilakukan pengujian pada produk pangan, yaitu dangke.

Kemampuan antibakteri dalam menghambat pertumbuhan bakteri dapat berlangsung melalui beberapa mekanisme, salah satunya adalah mengakibatkan gangguan pada membran sel bakteri (Cowan *et al.* 1999). Salah satu metode yang dapat digunakan adalah dengan mengamati efek kebocoran membran yang mengakibatkan terlepasnya material sitoplasma, khususnya senyawa-senyawa dengan berat molekul rendah dan komponen penyusun asam nukleat (Oonmetta-aree *et al.* 2006). Pelepasan material sitoplasma akibat kebocoran membran ini dapat diperiksa dengan mengukur absorbansi supernatan pada panjang gelombang 260 nm (Liu *et al.* 2004). Selain itu, metode lain yang dapat dilakukan adalah dengan pemanfaatan menggunakan mikroskop fluoresensi dengan memanfaatkan DNA probe sebagai penanda. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas antibakteri getah pepaya pada dangke selama penyimpanan pada suhu ruang (27-30°C serta pengaruh getah pepaya terhadap membran *Staphylococcus aureus*.

BAHAN DAN METODE

Bahan

Getah pepaya yang digunakan pada penelitian ini diperoleh dari buah pepaya varietas Calina IPB (*University Farm IPB*) yang dikumpulkan dengan cara menoreh buah dengan kedalaman kurang lebih 2 sampai 3 mm. Getah selanjutnya dikeringkan menggunakan oven vakum pada suhu 50–55°C selama 22 jam, kemudian digerus hingga menjadi bubuk dan ditentukan aktivitas proteolitiknya berdasarkan metode Bergmeyer (1984).

Persiapan papain dari getah pepaya (Modifikasi Nitsawang *et al.* 2006)

Getah pepaya segar dihomogenkan menggunakan buffer fosfat pH 8. Larutan yang diperoleh kemudian dibuat menjadi pH 5 dengan menggunakan HCl (Merck, USA) 6 M lalu diaduk selama 15 menit pada suhu 4°C. Filtrat dan bagian yang tidak larut dipisahkan dengan penyaringan menggunakan kertas saring Whatman no. 1. Protease yang larut pada filtrat dipresipitasi menggunakan etanol 96% dengan perbandingan 1:6 (v/v). Endapan yang diperoleh dipisahkan dengan sentrifugasi (Hermle, Jerman) pada kecepatan 4000 rpm pada suhu 4°C. Presipitat kemudian dikeringkan menggunakan oven vakum pada suhu 50°C hingga diperoleh papain kasar kering. Papain kasar yang diperoleh, dihitung rendemennya dan diukur aktivitas proteolitiknya dengan metode Bergemeyer (1984).

Persiapan ekstrak etanol getah pepaya (Modifikasi Wang *et al.* 2008)

Komponen bioaktif non-proteolitik getah pepaya diperoleh melalui proses ekstraksi menggunakan pelarut etanol.

Modifikasi yang dilakukan dari penelitian Wang *et al.* 2008 adalah konsentrasi etanol yang digunakan sebesar 96%. Campuran getah pepaya kering dan etanol dengan perbandingan 1:20 (b/v) diultrasonikasi menggunakan BRANSONIC Ultrasonic cleaner 8510E-MTH, USA selama 20 menit. Larutan getah yang telah melalui proses ultrasonikasi disaring menggunakan kertas Whatman no.1. Filtrat kemudian dipekatkan dengan evaporasi menggunakan *rotary evaporator* (BUCHI, Switzerland) pada suhu 40°C. Filtrat pekat kemudian dihembus dengan gas nitrogen hingga diperoleh berat konstan untuk mendapatkan ekstrak etanol kering.

Persiapan kultur *S. aureus* (Oonmetta-aree *et al.* 2006)

Kultur *S. aureus* yang berada dalam media *Trypticase Soy Agar* (TSA) miring diinokulasikan ke media *Brain Heart Infusion Broth* (BHIB) lalu diinkubasi selama 18 sampai 24 jam pada suhu 37°C. Suspensi bakteri yang diperoleh kemudian digores pada media TSA di cawan lalu diinkubasi selama 48 jam pada suhu 37°C. Koloni identik dan tunggal diambil lalu diinkubasikan ke dalam 10 mL media TSB dan diinkubasi selama 18 sampai 24 jam pada suhu 37°C. Penghitungan jumlah koloni dilakukan berdasarkan metode BAM (2003). Suspensi *S. aureus* pada media TSB digunakan sebagai kultur kerja untuk pengujian aktivitas antibakteri getah pepaya kering, papain, dan ekstrak etanol getah pepaya.

Pengujian aktivitas antibakteri getah pepaya pada media pertumbuhan (Modifikasi Eshamah *et al.* 2013)

Aktivitas antibakteri getah pepaya pada media pertumbuhan diuji dengan menggunakan metode kontak pada media cair. Kontak antara bakteri dengan komponen antibakteri dilakukan pada tabung reaksi, berbeda dengan Eshamah *et al.* 2013 yang melakukan kontak pada cawan petri. Getah pepaya kering atau papain dimasukkan ke dalam 2 mL TSB (Oxoid, UK) hingga diperoleh konsentrasi yang setara dengan konsentrasi getah pepaya segar yang digunakan pada pembuatan dangke berdasarkan aktivitas proteolitiknya (2.7×10^{-3} g/100 mL untuk getah pepaya kering dan 0.1×10^{-3} g/100 mL untuk papain). Sebanyak 20 μ L *S. aureus* dengan konsentrasi 10^6 CFU/mL ditambahkan ke dalam 1.98 mL media sehingga diperoleh konsentrasi sekitar 10^4 CFU/mL kemudian diinkubasi dengan inkubator bergoyang selama 24 jam pada suhu 37°C. Penurunan jumlah *S. aureus* akibat aktivitas antimikroba ditentukan dengan menumbuhkan bakteri yang telah dipaparkan dengan antimikroba selama 24 jam pada media TSA (Oxoid, UK) dan dihitung dengan menggunakan metode BAM (2003).

Pengujian penghambatan *S. aureus* pada dangke oleh getah pepaya dan papain

Dangke dibuat dengan memanaskan susu sapi segar hingga dicapai suhu 63°C selama 10 menit. Setelah suhu diturunkan hingga 50°C, 2.7×10^{-3} g/100 mL getah pepaya kering atau 0.1×10^{-3} g/100 mL papain ditambahkan ke dalam 100 mL susu. CaSO_4 1% juga digunakan sebagai koagulan untuk membuat dangke, sebagai kontrol negatif. Pemanasan terus dilanjutkan dengan pengadukan hingga protein susu menggumpal dan terjadi pemisahan antara *curd* dan *whey*. *Curd*

disaring dan dipadatkan hingga air yang ada pada *curd* tidak tersisa lagi. Dangke disimpan pada jar steril selama 48 jam pada suhu ruang. Jumlah *S. aureus* yang tumbuh pada dangke dihitung pada 0, 6, 24, dan 48 jam selama penyimpanan dangke pada suhu ruang berdasarkan metode BAM (2003).

Pengujian aktivitas antibakteri ekstrak etanol getah pepaya

Pengujian awal aktivitas antibakteri ekstrak etanol getah pepaya dilakukan dengan menentukan zona hambat menggunakan metode difusi sumur berdasarkan Baskaran *et al.* (2012). Suspensi *S. aureus* dengan konsentrasi 10^8 CFU/mL disebarkan menggunakan *cotton bud* steril pada media *Mueller Hinton Agar* (Oxoid, UK) lalu dibuat sumur dengan *cork borer* steril berdiameter 4 mm. Sebanyak 20 μ L ekstrak etanol getah pepaya dengan konsentrasi masing-masing 100, 32, 16, 8, and 4 mg/mL diteteskan ke sumur. Cawan kemudian didiamkan selama kurang lebih satu jam pada suhu ruang (27-30°C) untuk memberi kesempatan antibakteri berdifusi ke agar lalu diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Zona penghambatan ekstrak etanol getah pepaya yang ditandai dengan terbentuknya zona bening diukur diameternya.

Aktivitas antibakteri ekstrak etanol getah pepaya selanjutnya diuji dengan menentukan konsentrasi hambat minimum (KHM₉₀) menggunakan metode pengenceran makro (*macrodilution*) berdasarkan Cosentino *et al.* (1999). KHM₉₀ merupakan konsentrasi dimana antimikroba mampu menurunkan jumlah bakteri sebanyak 90% atau 1 logaritma. Senyawa antibakteri dimasukkan ke dalam tabung berisi TSB sebanyak 2 mL dan dibuat seri pengenceran dua kali, sehingga diperoleh konsentrasi antibakteri masing-masing 16, 8, 4, dan 2 mg/mL. Masing-masing tabung kemudian ditambahkan *S. aureus* dengan konsentrasi 10^6 CFU/mL sebanyak 200 μ L sehingga diperoleh konsentrasi bakteri 10^5 CFU/mL. Inkubasi dilakukan dengan menggunakan inkubator bergoyang pada suhu 37°C selama 24 jam. KHM₉₀ ditentukan dengan menghitung penurunan jumlah *S. aureus*,

Pengujian pelepasan material sitoplasma akibat kerusakan membran (Modifikasi Oonmetta-aree *et al.* 2006)

Getah pepaya kering atau papain ditambahkan ke dalam 1 mL suspensi bakteri hingga diperoleh konsentrasi yang setara dengan setengah, satu, dua, dan tiga kali konsentrasi getah pepaya segar pada pembuatan dangke berdasarkan aktivitas proteolitik (2.7×10^{-3} g/100 mL untuk getah pepaya kering dan 0.1×10^{-3} g/100 mL untuk papain). Ekstrak etanol getah pepaya ditambahkan ke 1 mL suspensi bakteri hingga diperoleh konsentrasi yang setara dengan setengah, satu, dan dua kali nilai KHM₉₀ ekstrak etanol getah pepaya. Pemaparan dilakukan selama 2 jam pada suhu 37°C. Kebocoran material sitoplasma ditentukan dengan mengukur material sel yang ada di dalam supernatan menggunakan spektrofotometer (Shimadzu UV 1800, Jepang) pada panjang gelombang 260 nm.

Pengamatan kerusakan membran sel dengan mikroskop fluoresens (Modifikasi Berney *et al.* 2007)

Pengujian pengaruh antibakteri terhadap *S. aureus* dilakukan dengan cara sel bakteri yang telah dipisahkan dengan media dicuci sebanyak dua kali dengan NaCl 0.85% steril lalu

diresuspensi menggunakan NaCl 0.85% dan dikonsentrasikan hingga konsentrasi kira-kira 10^8 CFU/mL. Getah pepaya kering atau papain ditambahkan ke 1 mL suspensi bakteri hingga diperoleh konsentrasi yang setara dengan konsentrasi getah pepaya segar pada pembuatan dangke berdasarkan aktivitas proteolitik (2.7×10^{-3} g/100 mL untuk getah pepaya kering dan 0.1×10^{-3} g/100 mL untuk papain). Ekstrak etanol getah pepaya ditambahkan ke 1 mL suspensi bakteri hingga diperoleh konsentrasi yang setara dengan nilai KHM. Pemaparan dilakukan selama 2 jam pada suhu 37°C. Pewarnaan dilakukan dengan menggunakan 200 μ L SYBR Green (KAPA Biosystem, USA) dan 200 μ L propidium iodida 0.2 mg/mL (Invitrogen, UK) lalu diinkubasi selama 15 menit pada suhu ruang dan kondisi gelap, kemudian diamati menggunakan mikroskop fluoresens (Olympus CH30, Jepang). Sel dengan membran yang utuh menghasilkan fluoresensi hijau, sedangkan sel dengan membran yang rusak menghasilkan fluoresensi merah. Fluoresensi merah terbentuk pada eksitasi maksimum 535 nm dan emisi maksimum 617 nm.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Karakteristik getah pepaya segar, getah pepaya kering dan papain

Karakteristik getah pepaya segar, getah pepaya kering, dan papain disajikan pada Tabel 1. Kadar air getah pepaya segar adalah sebesar 81 % (basis basah), hal ini sesuai dengan yang dilaporkan oleh El Moussaoui *et al.* (2001) yaitu kadar air getah pepaya segar adalah sekitar 85%. Aktivitas proteolitik getah pepaya kering adalah 723 ± 20 U/g per berat kering enzim dan aktivitas proteolitik papain adalah 678 ± 5.4 U/g per berat kering enzim. Getah pepaya segar memiliki aktivitas proteolitik sebesar 371 ± 2 U/g per berat basah enzim, Nitsawang *et al.* (2006) melaporkan aktivitas proteolitik getah pepaya segar varietas Thai adalah sebesar 529 ± 162 U/g. Perbedaan aktivitas proteolitik yang diperoleh ini dipengaruhi oleh perbedaan jenis pepaya yang digunakan seperti yang dinyatakan oleh Chaiwit *et al.* (2007). Aktivitas proteolitik komponen getah pepaya pada penelitian ini diukur sebagai acuan untuk menyetarakan jumlah getah pepaya kering dan papain yang digunakan sebagai pengganti getah pepaya segar pada pembuatan dangke berdasarkan jumlah yang diaplikasikan di masyarakat.

Tabel 1. Karakteristik getah pepaya segar, getah pepaya kering, dan papain¹⁾

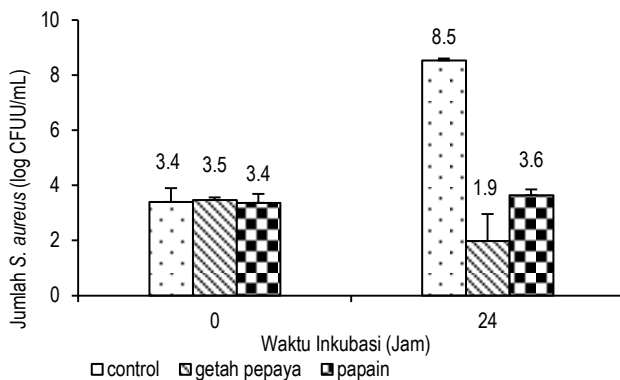
Komponen	Kadar Air (%)	Rendemen (%)	Aktivitas Proteolitik (U/g) ²⁾	Aktivitas Proteolitik (U/g) ³⁾
Getah segar	81 \pm 0.3	-	1944.9 \pm 10	371 \pm 2
Getah kering	9.8 \pm 0.2	17.1 \pm 1.26	722.5 \pm 20	652 \pm 18
Papain	3.4 \pm 0.1	1.5 \pm 0.28	687.0 \pm 5	656 \pm 5

Keterangan: 1) Data disajikan dalam rata-rata \pm SD; 2) Aktivitas per berat kering getah dan papain; 3) Aktivitas per berat basah getah dan papain

Aktivitas antibakteri getah pepaya dan papain pada media pertumbuhan dan dangke

Gambar 1 menunjukkan getah pepaya kering mampu menurunkan jumlah *S. aureus* sebanyak 1 log dari jumlah awal

(dari 3.0×10^3 menjadi 2.5×10^2 CFU/mL). Papain cenderung mampu mempertahankan jumlah *S. aureus* (dari 2.7×10^3 menjadi 4.7×10^3 CFU/mL) setelah 24 jam pada media pertumbuhan. Hasil ini mengindikasikan getah pepaya memiliki kemampuan penghambatan yang lebih tinggi dibanding papain. Kemampuan getah pepaya yang lebih tinggi ini dipengaruhi oleh kandungan getah pepaya yang lebih kompleks bila dibandingkan papain yang telah dipisahkan dari komponen aktif lainnya (Chaiwut *et al.* 2007). Konsentrasi getah pepaya kering dan papain yang digunakan pada penelitian ini berturut-turut adalah 2.7×10^{-3} dan 0.1×10^{-3} g/100 mL. Konsentrasi ini setara dengan jumlah getah pepaya segar yang digunakan pada pembuatan dangke di masyarakat berdasarkan aktivitas proteolitik.

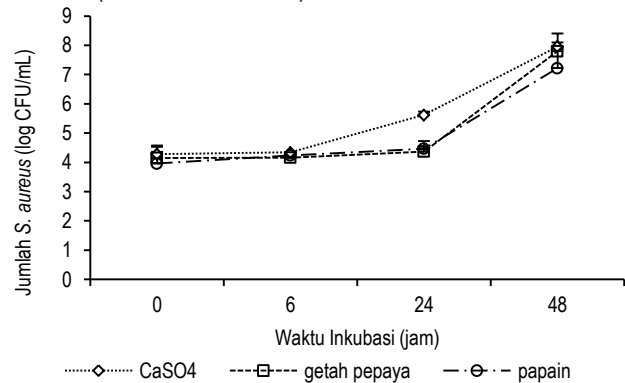


Gambar 1. Aktivitas antibakteri getah pepaya kering dan papain terhadap *S. aureus* pada media TSB selama 24 jam

Hasil yang ditunjukkan pada Gambar 2 memperlihatkan getah pepaya kering dan papain mampu menghambat pertumbuhan *S. aureus* pada penyimpanan dangke selama 6 hingga 24 jam pada suhu ruang (27-30°C). Jumlah *S. aureus* mengalami peningkatan setelah disimpan selama 24 hingga 48 jam dengan kecepatan yang sama seperti pada perlakuan kontrol CaSO_4 . Hasil yang diperoleh ini menunjukkan getah pepaya kering dan papain yang digunakan sebagai bahan penggumpal pada pembuatan dangke memiliki kemampuan menghambat laju pertumbuhan *S. aureus* yang mengontaminasi produk ini. Dangke merupakan produk berbasis susu yang cenderung berisiko terkontaminasi oleh *S. aureus*. De Oliveira *et al.* (2011) menemukan kontaminasi *S. aureus* pada beberapa produk susu pasteurisasi. *S. aureus* cenderung mengontaminasi makanan jadi yang diolah dan ditangani secara tidak higienis (Singh *et al.* 2010).

Aktivitas antibakteri getah pepaya kering pada dangke lebih rendah bila dibandingkan aktivitasnya pada media pertumbuhan. Getah pepaya kering pada dangke tidak dapat mereduksi jumlah *S. aureus* seperti pada media pertumbuhan yang diperlihatkan pada Gambar 1 dan 2. Hal ini diduga karena bahan pangan merupakan bahan yang kompleks dan mengandung beberapa macam komponen gizi yang diduga dapat mendukung pertumbuhan *S. aureus* dan menghambat aktivitas antibakteri. Selain itu, juga diduga bahan antibakteri berikatan secara tidak dapat balik dengan sel bakteri, partikulat, dan komponen bahan pangan sehingga sisi aktif bahan antibakteri

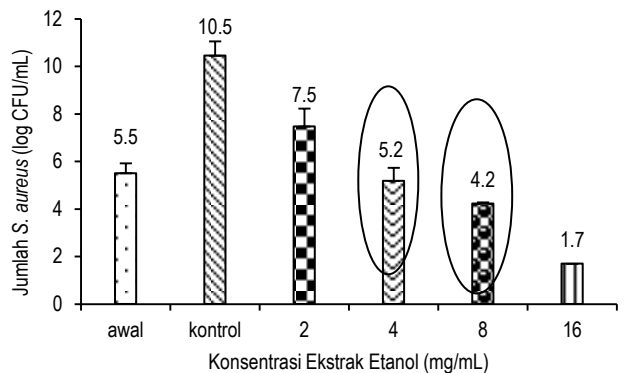
ini kehilangan aktivitasnya terhadap sel lain yang belum berikatan (Rhoades *et al.* 2000).



Gambar 2. Aktivitas antibakteri getah pepaya kering dan papain pada dangke selama penyimpanan 48 jam pada suhu ruang (27-30°C)

Aktivitas antibakteri ekstrak etanol getah pepaya

Konsentrasi terendah yang mampu menghambat pertumbuhan yang berbeda nyata adalah 16 mg/mL yaitu sebesar 0.76 mm (data tidak ditampilkan). Konsentrasi ini selanjutnya digunakan pada penentuan KHM_{90} . Akujobi *et al.* (2010) menggunakan ekstrak air pepaya muda 100% dan memperoleh zona hambat sebesar 26 mm pada suhu 30°C. Pada pengujian etanol dan DMSO yang digunakan sebagai kontrol negatif tidak menunjukkan penghambatan terhadap *S. aureus*. Hasil yang diperoleh menunjukkan nilai KHM_{90} ekstrak etanol getah pepaya sebesar 8 mg/mL (Gambar 3).



Keterangan: Gambar batang yang pertama menunjukkan jumlah awal *S. aureus* yang digunakan untuk pengujian

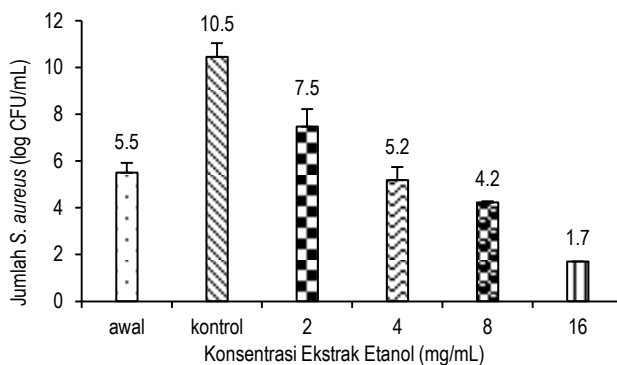
Gambar 3. Penghambatan ekstrak etanol getah pepaya terhadap *S. aureus* pada media TSB setelah inkubasi 24 jam

Baskaran *et al.* (2012) melaporkan komponen fitokimia yang diekstraksi daun pepaya menunjukkan efek penghambatan terhadap beberapa bakteri. Hasil lain yang dilaporkan oleh Ashok *et al.* (2011) menunjukkan kemampuan ekstrak petroleum eter dan metanol getah pepaya menghambat pertumbuhan *E. coli*, *P. aeruginosa*, dan *S. aureus*. Sifat antibakteri ekstrak bagian tanaman getah pepaya ini dipengaruhi oleh kandungan senyawa aktif yang dikandung oleh ekstrak getah pepaya yaitu flavonoid, alkaloid, tanin, triterpenoid, seroid, dan saponin (Krishna *et al.* 2008). Adejuwon *et al.* (2011) melapor-

kan nilai KHM₉₀ ekstrak metanol dan air akar pepaya yang mengandung flavonoid, alkaloid, tannin, dan glikosida masing-masing adalah 2.0 mg/mL dan 8.0 mg/mL.

Pengaruh antibakteri terhadap membran sel *S. aureus*

Hasil pengukuran absorbansi untuk masing-masing perlakuan yang diperlihatkan pada Gambar 4 menunjukkan perubahan nilai absorbansi seiring perubahan konsentrasi antibakteri yang digunakan. Perubahan nilai absorbansi supernatan menandakan terjadi perubahan jumlah komponen yang mampu menyerap cahaya pada panjang gelombang 260 nm yang dilepaskan dari dalam sel akibat aktivitas antibakteri. Penurunan nilai absorbansi mengindikasikan senyawa antibakteri tidak mengakibatkan efek kebocoran membran sel lagi kemungkinan disebabkan oleh efek subletal yang memberikan kemampuan bagi bakteri untuk melakukan osmoregulasi terhadap senyawa toksik (Carson *et al.* 2002). Hasil ini mengindikasikan getah pepaya kering, papain, dan ekstrak etanol mampu mengakibatkan kebocoran membran sel pada konsentrasi tertentu.



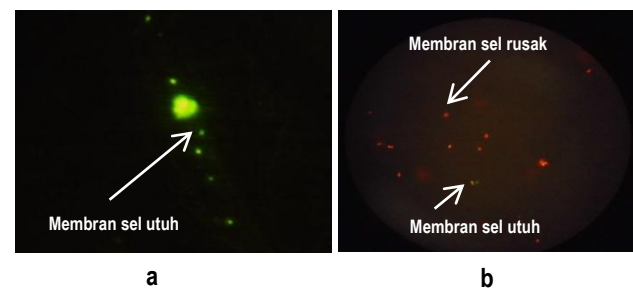
Keterangan: Konsentrasi adalah kelipatan jumlah getah pepaya kering dan papain yang digunakan pada pembuatan dangke dan nilai KHM ekstrak etanol getah pepaya

Gambar 4. Absorbansi 260 nm supernatan *S. aureus* setelah pemaparan dengan bahan antibakteri selama 2 jam

Metode deteksi lain yang digunakan pada penelitian ini adalah dengan pengamatan menggunakan mikroskop fluoresens. Gambar 5a menunjukkan sel utuh yang diwarnai dengan SYBR Green dan PI menghasilkan fluoresensi hijau. SYBR Green merupakan pewarna DNA yang mampu berdifusi ke dalam sel sehingga mampu mewarnai sel baik yang memiliki membran yang utuh maupun yang rusak. Broadaway *et al.* (2003) menggunakan SYBR Green untuk mendeteksi keberadaan bakteri dalam jumlah yang sedikit dengan cepat menggunakan *laser-cytometry*. Sel dengan membran yang rusak diperlihatkan pada Gambar 5b, warna merah dihasilkan dari ikatan antara pewarna PI dengan DNA. PI tidak mampu berdifusi ke dalam sel dengan membran utuh karena ukurannya yang besar (BM 668.4) sehingga hanya mampu masuk ke dalam sel bila terdapat bagian yang rusak pada membran (Giao *et al.* 2009), yang pada penelitian ini diakibatkan oleh aktivitas getah pepaya kering, papain, ekstrak etanol.

Sifat PI yang tidak mampu berdifusi melalui sel yang utuh dan hanya mampu masuk melalui membran yang mengalami

kerusakan inilah yang dimanfaatkan pada pengujian untuk membedakan sel yang utuh dengan sel yang mengalami kebocoran. PI yang masuk ke dalam sel berikatan dengan komponen asam nukleat dan menghasilkan fluoresensi merah (Santo *et al.* 2011). Penggunaan PI sebagai pewarna untuk mendeteksi kerusakan sel telah dilakukan oleh Otto *et al.* (2010) yang menguji efek campuran mineral CB07 dan BY07 terhadap integritas membran *S. aureus* dan *E. coli*. PI yang masuk ke dalam sel akan menggantikan posisi pewarna lain dan menghilangkan efek fluoresensi yang dihasilkan oleh pewarna sebelumnya, yang dalam hal ini adalah SYBR Green, sehingga yang tampak di bawah mikroskop fluoresens adalah fluoresensi merah (Berney *et al.* 2007).



Gambar 5. Penampakan *S. aureus* setelah pemaparan dengan getah pepaya kering, papain, dan ekstrak etanol getah pepaya dengan konsentrasi 1 kali KHM₉₀ selama 2 jam di bawah mikroskop fluoresens. (a) fluoresensi hijau dihasilkan oleh sel dengan membran yang utuh dan (b) fluoresensi merah dihasilkan oleh sel yang mengalami kebocoran membran

Getah pepaya kering mampu mengakibatkan kebocoran pada membran sel bakteri akibat aktivitas senyawa-senyawa aktif yang dikandungnya, antara lain adalah enzim papain, yang merupakan salah satu enzim proteolitik (El Moussaoui *et al.* 2001). Membran sel bakteri Gram positif dilapisi oleh dinding sel yang tersusun atas peptidoglikan dan mengandung GlcNAc, N-acetyl murmeric acid dan asam amino D- dan L- yang mampu berikatan dengan ion positif dari senyawa antibakteri. Protein yang menyusun membran sel bakteri inilah yang menjadi target kerja papain yang terdapat pada getah pepaya. Terganggunya struktur protein pada membran sel mengakibatkan gangguan permeabilitas membran sel seperti yang dilaporkan oleh Seenivasan *et al.* (2010). Hal ini dibuktikan dengan perubahan nilai absorbansi supernatan yang diperoleh setelah pemaparan *S. aureus* dengan bahan antibakteri seperti yang ditunjukkan pada Gambar 4 dan terbentuknya fluoresensi merah setelah pewarnaan dengan PI (Gambar 5b).

KESIMPULAN

Penggunaan getah pepaya kering pada pembuatan dangke selain berfungsi sebagai bahan penggumpal juga berperan sebagai komponen yang mampu menahan pertumbuhan *S. aureus* bila dibandingkan dengan kontrol sehingga tidak menjadi lebih banyak selama penyimpanan 24 jam pada suhu ruang (27-30°C). Papain dan komponen non-proteolitik getah pepaya yang diekstraksi dengan etanol juga menunjukkan

kemampuan menghambat pertumbuhan *S. aureus* hingga 90% pada media TSB. Mekanisme penghambatan *S. aureus* oleh getah pepaya kering, papain, dan ekstrak etanol getah pepaya adalah dengan menyebabkan kerusakan pada membran sel bakteri yang ditunjukkan dengan peningkatan nilai absorbansi 260 nm dan pengikatan PI oleh DNA *S. aureus* yang diamati dengan mikroskop fluoresens.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini dapat terlaksana atas bantuan dana penelitian dari Hibah Penelitian Unggulan Perguruan Tinggi tahun 2013 dengan nomor kontrak 62/IT3.41.2/LI/SPK/2013, Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi Kementerian Pendidikan dan Kebudayaan.

DAFTAR PUSTAKA

- Adejuwon AO, Agbaje EO, Idika N. 2011. Antifungal and antibacterial activities of aqueous and methanolic root extracts of *Carica papaya* linn. (Caricaceae). *Int Res J Microbiol* 2: 270-277.
- Akujobi CN, Ofodeme CN, Enweani CA. 2010. Determination of antibacterial activity of *Carica papaya* (paw-paw) extracts. *Niger J Clin Pract Nigerian* 13: 55-57.
- Aravind G, Bhowmik D, Duraivel S, Harish G. 2013. Traditional and Medicinal Uses of *Carica papaya*. *J Med Plant Stu* 1: 7-15.
- Aref HL, Salah KBH, Chaumont JP, Fekih A, Aouni M, Said K. 2010. *In vitro* antimicrobial activity of four *Ficus carica* latex fractions against resistant human pathogens (Antimicrobial activity of *Ficus carica* latex). *Pak J Pharm Sci* 23: 53-58.
- Arekemase MO, Kayode RMO, Ajiboye AE. 2011. Antimicrobial activity and phytochemical analysis of *Jatropha curcas* plant against some selected microorganisms. *Int J Bio* 3: 52-59.
- Ashok CD, Prachu BM, Umesh JU, Manohar PV. 2011. Antibacterial and antioxidant activity of plant latex. *J Pharm Res* 4: 406-407.
- [BAM] Bacterial Analytical Manual . 2003. Chapter 3 Aerobic plate count. [FDA] Food and Drug Administration. www.fda.gov. [30 Januari 2013].
- Baskaran C, Ratha bai V, Velu S, Kumaran K. 2012. The efficacy of *Carica papaya* leaf extract on some bacterial and a fungal strain by well diffusion method. *Asian Pac J Trop Dis* 2: S658-662. DOI: 10.1016/S2222-1808(12)60239-4.
- Bergmeyer HU (ed). 1984. *Methods of Enzymatic Analysis*, Vol V. 3rd edition. 121. Verlag Chemie, Weinheim.
- Berney M, Hammes F, Bosshard F, Weilenmann H, Egli T. 2007. Assessment and interpretation of bacterial kit in combination with flow cytometry viability by using the LIVE/DEAD BacLight. *Appl Environ Microb* 73: 3283-3290. DOI: 10.1128/AEM.02750-06.
- Carson CF, Mee BJ, Riley TV. 2002. Mechanism of action of *Malaleuca alternifolia* (tea tree) oil on *Staphylococcus aureus* determined by time-kill, lysis, leakage, and salt tolerance assays and electron microscopy. *Antimicrob Agents Ch* 46: 1914-1920. DOI: 10.1128/AAC.46.6.1914-1920.2002.
- Chaiwut P, Nitsawang S, Shank L, Kanasawud P. 2007. A comparative study on properties and proteolytic components of papaya peel and latex proteases. *Chiang Mai J Sci* 34: 109-118.
- Cosentino S, Tuberoso CIG, Pisano B, Satta M, Mascia V, Arzedi E, Palmas F. 1999. *In-vitro* antimicrobial activity and chemical composition of sardinian *Thymus* essential oils. *Lett Appl Microb* 29: 130-135.
- Cowan MM. 1999. Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews* 12: 564-582.
- De Oliveira LP, Barros LSS, Silva VC, Cirqueria MG. 2011. Study of *Staphylococcus aureus* in raw and pasteurized milk consumed in the Reconcavo area of the State of Bahia, Brazil. *J Food Process Technol* 2: 1-5. DOI: 10.4172/2157-7110.1000128.
- El Moussaoui A, Nijs M, Paul C, Wintjens R, Vincentelli J, Azarkan M, Looze Y. 2001. Review : Revisiting the Enzyme Storage in the Laticifers of *Catica papaya* in the Contxt of their possible participation in the plant defence mechanism. *Cell Mol Life Sci* 58: 556-570. DOI: 10.1007/PL00000881.
- Eshamah H, Han I, Naas H, Rieck J, Dawson P. 2013. Bactericidal effects of natural tenderizing enzymes on *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes*. *J Food Res* 2: 8-18. DOI: 10.5539/jfr.v2n1p8.
- Geantaresa E, Supriyanti FMT. 2010. Pemanfaatan ekstrak kasar papain sebagai koagulan pada pembuatan keju *Cottage* menggunakan bakteri. *J Sains dan Teknologi Kimia* 1: 38-43.
- Giao MS, Wilks SA, Azevedo NF, Vieira MJ. 2009. Validation of SYTO 9/propidium iodide uptake for rapid detection of viable but noncultivable legionella pneumophila. *Microb Ecol* 58: 56-62. DOI: 10.1007/s00248-008-9472-x.
- Krishna KL, Paridhavi M, Patel JA. 2004. Review on nutritional, medicinal and pharmacological properties of Papaya (*Carica papaya* Linn.). *Nat Prod Rad* 4: 364-373.
- Liu H, Du Y, Wang X, Sun L. 2004. Chitosan kills bacteria through cell membrane damage. *Int J Food Microbiol* 95: 147-155. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2004.01.022
- Nitsawang S, Hatti-Kaul R, Kanasawud P. 2006. Purification of papain from *Carica papaya* Latex: aqueous two-phase extraction versus two-step salt precipitation. *Enzyme Microb Tech* 39: 1103-1107. DOI: 10.1016/j.enzymitec.2006.02.013.
- Onmetta-aree J, Suzuki T, Gasaluck P, Eumkeb G. 2006. Antimicrobial properties and action of galangal (*Alpina galangal* Linn.) on *Staphylococcus aureus*. *LWT - Food Sci Technol* 39: 1214-1220. DOI: 10.1016/j.lwt.2005.06.015.
- Otto CC, Cunningham TM, Hansen MR, Haydel SE. 2010. Effects of antibacterial mineral leachates on the cellular ultrastructure, morphology, and membrane integrity of *Escherichia coli* and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials* 9: 1-13. DOI: 10.1186/1476-0711-9-26.

- Rhoades J, Roller S. 2000. Antimicrobial actions of degraded and native chitosan against spoilage organisms in laboratory media and foods. *Appl Environ Microb* 66: 80-86. DOI: 10.1128/AEM.66.1.80-86.2000.
- Santo CE, Lam EW, Elowsky CG, Quaranta D, Domaille DW, Chang CJ, Grass G. 2011. Bacterial killing by dry metallic copper surfaces. *Appl Environ Microb* 77: 794-802. DOI: 10.1128/AEM.01599-10.
- Seenivasan R, Roopa L, Gheeta S. 2010. Investigation on purification, characterization and antimicrobial activity of enzyme papain from *Carica papaya* Linn. *J Pharm Res* 3: 1092-1095.
- Singh P, Prakash A. 2010. Prevalence of coagulase positive pathogenic *Staphylococcus aureus* in milk and milk products collected from unorganized sector of Agra. *Acta Argiculturae Slovencia* 96: 37-41.
- Wang J, Sun B, Cao Y, Tian Y, Li X. 2008. Optimisation of ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from wheat bran. *Food Chem* 106: 804-810. DOI: 10.1016/j.foodchem.2007.06.062.