

**UJI AKTIVITAS ANTIMIKROBA DENGAN MASERASI EKSTRAK
DAUN PEPAYA (*Carica papaya L.*) MENGGUNAKAN METODE
BIOAUTOGRAFI TERHADAP BAKTERI *Bacillus subtilis***

Alfi Nuril Qamari, Akademi Farmasi Surabaya

Tri Puji Lestari Sudarwati, Akademi Farmasi Surabaya

Anisa Rizki Amalia, Akademi Farmasi Surabaya

ABSTRAK

Pepaya (*Carica papaya L.*) merupakan tanaman yang telah lama digunakan oleh masyarakat sebagai obat tradisional. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas antibakteri ekstrak daun pepaya terhadap bakteri *Bacillus subtilis* dengan menggunakan metode bioautografi. Bioautografi merupakan metode yang digunakan untuk mendeteksi senyawa yang mempunyai aktivitas antibakteri dimana plat KLT ditempelkan diatas media yang telah diinokulasi bakteri. Daun pepaya (*Carica papaya L.*) diekstraksi dengan maserasi menggunakan pelarut etanol 96 %. Konsentrasi yang digunakan adalah 2%, 4%, 6%, 8%, 10%.

Hasil uji KLT (Kromatografi Lapis Tipis) menunjukkan bahwa terdapat 3 noda dengan Rf berbeda 0,46, 0,63, dan 0,93. Hasil bioautografi diperoleh zona hambat pada noda dengan Rf 0,93. Hasil identifikasi menunjukkan bahwa noda tersebut adalah tanin. Hasil pengukuran nilai rata – rata zona hambat yang diperoleh adalah 4,4 mm dengan kategori lemah, 5,4 mm, 5,8 mm, 6,6 mm, dan 7,3 mm dengan kategori sedang

Berdasarkan hasil uji anova one way diperoleh nilai signifikansi yaitu <0,05. Hal ini menunjukkan bahwa terdapat perbedaan zona hambat pada berbagai konsentrasi ekstrak daun pepaya dan dapat disimpulkan bahwa ekstrak daun pepaya memiliki aktivitas antibakteri terhadap bakteri *Bacillus subtilis*.

Keywords :*Carica papaya L.*, *Bacillus subtilis*, Bioautografi, Kromatografi Lapis Tipis

ABSTRACT

Papaya (*Carica papaya L.*) is a plant which had been used by society since long time ago as a traditional medicine. The research aims to know antibacterial activity of the papaya leaf extract against bacterial *Bacillus subtilis* by bioautography method. Bioautography is the method used to detected compounds that have antibacterial activity where is the TLC plate placed on the media that inoculated *Bacillus subtilis*. The Papaya leaf (*Carica papaya L.*) was extracted by maceration methods using ethanol 96%. The concentrations used were 2%, 4%, 6%, 8%, 10%.

Thin Layer Chromatography (TLC) with eluen n-butanol : asetat acid :water (4 : 1 : 5) The result of TLC showed three spot with different Rf value are 0,46, 0,63, and 0,93. The result of bioautography is obtained inhibitory zone at spot with Rf 0,93. Result of identification shown that the spots are tanin. The results of the measured mean values of the inhibited zone were 4,4 mm with weak category, 5,4 mm , 5,8 mm, 6,6 mm, and 6,6 mm with medium category.

Anova one way test resut, obtained a significant value, namely sig < 0,05. It can be said that there are inhibition zone different of various concentration of papaya leaf extract and can be concluded that papaya leaf extract has antibacterial activity against *Bacillus subtilis* bacteria. So the greater concentration used, the greater the activity in inhibiting bacterial growth.

Keywords : *Carica papaya L.*, *Bacillus subtilis*, Bioautography, Thin Layer Chromatography

PENDAHULUAN

Indonesia mempunyai kekayaan alam yang melimpah dimana banyak jenis tumbuhannya yang dapat digunakan sebagai obat tradisional. Kesadaran masyarakat untuk kembali ke alam (*back to nature*) menumbuhkan semakin tingginya minat masyarakat untuk menggunakan obat tradisional. Hal ini disebabkan karena obat tradisional memiliki efek samping yang relatif sedikit

namun memiliki banyak khasiat. Salah satu tanaman yang dapat digunakan sebagai obat tradisional adalah tanaman pepaya.

Tanaman pepaya merupakan tanaman herba yang mempunyai tinggi mencapai 10 m. Hampir semua bagian dari tanaman pepaya seperti daun, buah, batang, dan akarnya dapat dimanfaatkan sebagai obat. Salah satu bagian tanaman pepaya yang dapat digunakan sebagai obat tradisional adalah daun pepaya. Daun pepaya dikenal sebagai obat penyakit malaria, penurun demam, menambah nafsu makan, dan memperbaiki pencernaan (Suharmiati dan Handayani, 2007 *dalam* Anggrahini dkk, 2013). Ekstrak daun pepaya mengandung komposisi senyawa kimia yaitu flavonoid, vitamin C, tannin, alkaloid, karpain, *cyanogenic glucosides* dan enzim papain (Eleazu 2015 *dalam* Pratiwi dkk, 2015). Berdasarkan hasil uji fotokimia ekstrak etanol dan ekstrak air kulit kayu akway terdeteksi adanya tannin, saponin, dan alkaloid serta dikatakan bahwa senyawa tanin mempunyai aktivitas antibakteri (Ismunandar, 2008). Hal ini menunjukkan bahwa ekstrak daun pepaya memiliki fungsi untuk menghambat pertumbuhan bakteri yang dapat menyebabkan infeksi. Salah satu bakteri yang dapat menyebabkan infeksi adalah bakteri *Bacillus subtilis*. Bakteri patogen yang sering menimbulkan penyakit salah satu diantaranya adalah *Bacillus subtilis*.

Bacillus subtilis merupakan bakteri Gram positif berbentuk batang. *Bacillus subtilis* berperan dalam penurunan protein, pati dan pektin didalam tubuh dan dapat mengakibatkan keracunan makanan, meningitis dan infeksi pada mata (Ryan dan Ray, 2004 *dalam* Prabowo, 2015). Suresh K, Deepa P, Harisaranraj, dan Vaira Achudan V tahun 2008 telah melakukan penelitian mengenai aktivitas antibakteri daun pepaya dan terbukti memiliki efek antibakteri terhadap bakteri gram positif salah satunya adalah *Bacillus subtilis*.

Berdasarkan penelitian, ekstrak etanol pepaya memiliki aktivitas antibakteri secara *in vitro* terhadap bakteri *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, dan *Klebsiella pneumoniae* dengan metode difusi padat cakram berdiameter 6 mm. Hasil penelitian menunjukkan bahwa pada kadar 1,5 % dan 3 % ekstrak etanol daun pepaya mampu menghambat bakteri *Bacillus subtilis* dengan zona hambat masing – masing 12,0 mm dan 13,0 mm (Oladimeji dkk, 2007 *dalam* Soranta, 2009). Berdasarkan hasil penelitian

Yulianti tahun 2013, fraksi etil asetat ekstrak aseton kulit buah kakao secara bioautografi memberikan zona hambat sebesar $10,00 \pm 0,58$ mm terhadap *Bacillus subtilis* pada konsentrasi 3,0 mg/disk dan senyawa yang mempunyai aktivitas antibakteri adalah senyawa flavonoid dan fenolik. Sedangkan pada penelitian Handayani tahun 2013, fraksi metanol – air ekstrak etanol kulit buah kakao memiliki aktivitas antibakteri terhadap *Bacillus subtilis* dengan diameter zona hambat sebesar 9 ± 0 mm pada konsentrasi 1 mg/disk, 10 ± 0 mm pada konsentrasi 2 mg/disk, $10,58 \pm 0,38$ mm pada konsentrasi 2 mg/disk, 11 ± 0 mm pada konsentrasi 2,5 mg/disk, dan $11,25 \pm 0$ mm pada konsentrasi 3 mg/disk dan golongan senyawa yang bersifat antibakteri pada fraksi metanol – air ekstrak etanol kulit buah kakao adalah fenolik dan tannin. Dari kedua penelitian tersebut, dapat diketahui bahwa pada metode difusi cakram hanya dapat menunjukkan aktivitas antibakteri tanpa diketahui senyawa aktif yang bersifat sebagai antibakteri. Sedangkan pada metode bioautografi, dapat diketahui aktivitas antibakteri dan senyawa yang bersifat sebagai antibakteri.

Bioautografi sangat efisien untuk mendeteksi aktivitas suatu senyawa yang belum teridentifikasi yang mempunyai aktivitas antibakteri. Dari latar belakang tersebut, dilakukan penelitian aktivitas antibakteri ekstrak daun pepaya dengan metode maserasi etanol 96% menggunakan metode bioautografi.

METODE PENELITIAN

Alat dan Bahan

Alat – alat yang digunakan adalah kaca arloji, batang pengaduk, tabung reaksi, rak tabung reaksi, kawat ose, neraca analitik, erlenmeyer, cawan petri, beaker glass, gelas ukur, pipet volume, pipet tetes, bulb filler, plat Kromatografi Lapis Tipis (KLT), pipa kapiler, vortex, inkubator, autoklaf, oven, evaporator rotary.

Bahan – bahan yang digunakan adalah ekstrak daun pepaya, etanol 96%, *Nutrient Agar* (NA), *Nutrient Brooth* (NB), bakteri *Bacillus subtilis*, n – butanol, asam asetat, aquadest.

Pembuatan Ekstrak Daun Pepaya

Daun pepaya sebanyak 50 g diekstraksi dengan maserasi menggunakan pelarut etanol 96% sebanyak 500 ml. Ekstrak yang diperoleh dikentalkan dengan menggunakan *rotary evaporator*. Ekstrak kemudian dibuat konsentrasi 2%, 4%, 6%, 8%, 10%.

Pembuatan Media

Pembuatan suspensi bakteri *Bacillus subtilis* dengan mengambil satu goresan biakan *Bacillus subtilis* lalu disuspensikan ke dalam tabung reaksi yang sudah berisi *Nutrient Brooth* (NB) sebanyak 9 mL. Kemudian inkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C

Pembuatan media NA dengan menimbang 4 gram serbuk NA dengan menggunakan timbangan analitik dan larutkan ke dalam aquadest 200 mL. Panaskan diatas *hot plate* hingga berwarna jernih seperti minyak goreng. Kemudian media NA disterilkan dengan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit. Mengukur media NA yang masih cair sebanyak 15 mL dan tunggu sampai memadat. Setelah memadat, media NA diinokulasi dengan bakteri *Bacillus subtilis*. Inkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C.

Pengujian Bioautografi

Pemisahan senyawa dilakukan dengan metode KLT menggunakan eluen n-butanol : asam asetat : air (4 : 1 : 5). Hasil plat KLT yang telah dielusi kemudian ditempelkan di atas permukaan media NA yang sudah diinokulasikan bakteri 15–30 menit. Tujuannya adalah agar noda pada plat KLT berdifusi ke dalam media NA. Setelah 30 menit, lempeng KLT diangkat dan diinkubasi pada suhu 37°C. Pengamatan dilakukan dengan 5 perlakuan dan 5 kali pengulangan.

Data diperoleh dengan membandingkan diameter zona hambat dan nilai Rf dari masing - masing konsentrasi ekstrak Daun Pepaya (*Carica papaya L.*) dengan menggunakan uji Annova *One Way*.

HASIL dan PEMBAHASAN

Hasil yang didapatkan pada plat KLT setelah diamati dibawah sinar UV 366 nm menunjukkan adanya 3 noda dengan nilai Rf masing – masing sebesar 0,46,

0,62, dan 0,93. Menurut Harbone (1987) tanin yang amati di bawah sinar UV pendek akan menunjukkan noda berwarna lembayung

Berdasarkan hasil uji KLT yang telah dilakukan, maka diperoleh 3 noda dengan Rf yang berbeda. Hasil Rf yang diperoleh adalah sebagai berikut :

Tabel 1. Hasil Pengamatan Uji KLT

No	Jarak Noda (cm)	Rf
1.	3,7	0,46
2.	5	0,63
3.	7,5	0,93

Dari **Tabel 1.**, dapat dijelaskan bahwa uji KLT yang dihasilkan yaitu 3 noda dengan Rf yang berbeda. Pada jarak noda 3,7 cm menghasilkan Rf sebesar 0,46 berwarna hijau kehitaman, pada jarak noda 5 cm menghasilkan Rf sebesar 0,63 dan pada jarak noda 7,5 cm menghasilkan Rf sebesar 0,93 berwarna lembayung.

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan oleh Mukholifah tahun 2014 mengenai identifikasi senyawa tannin dan penentuan eluen terbaik dari ekstrak etanol 70% daun pepaya dengan metode Kromatografi Lapis Tipis (KLT), eluen terbaik yang digunakan untuk mengidentifikasi tanin yaitu n – butanol : asam asetat : air dengan perbandingan 4 : 1 : 5. Dari komposisinya eluen tersebut bersifat polar sedangkan tanin bersifat polar sehingga senyawa tanin dapat terangkut mengikuti aliran eluen (Mukholifah, 2014).

Berdasarkan hasil pengujian yang telah dilakukan, maka didapatkan hasil pengukuran zona hambat yaitu sebagai berikut :

Tabel 2. Hasil Pengukuran Zona Hambat Ekstrak Daun Pepaya (*Carica papaya L.*) Terhadap Bakteri *Bacillus subtilis*

Replikasi	Konsentrasi				
	2%	4%	6%	8%	10%
1	4,5 mm	5,7 mm	6,0 mm	6,8 mm	7,4 mm
2	4,2 mm	4,9 mm	5,7 mm	6,1 mm	7,0 mm
3	4,4 mm	5,5 mm	5,8 mm	6,7 mm	7,3 mm
4	4,7 mm	5,8 mm	6,2 mm	6,8 mm	7,5 mm
5	4,4 mm	5,2 mm	5,7 mm	6,3 mm	7,4 mm
Rata – Rata	4,4 mm	5,4 mm	5,8 mm	6,6 mm	7,3 mm
Kategori	Lemah	Sedang	Sedang	Sedang	Sedang

Terjadinya penghambatan mikroba terhadap pertumbuhan koloni bakteri juga disebabkan karena kerusakan yang terjadi pada komponen struktural membran sel bakteri. Membran sel yang tersusun atas protein dan lipid sangat

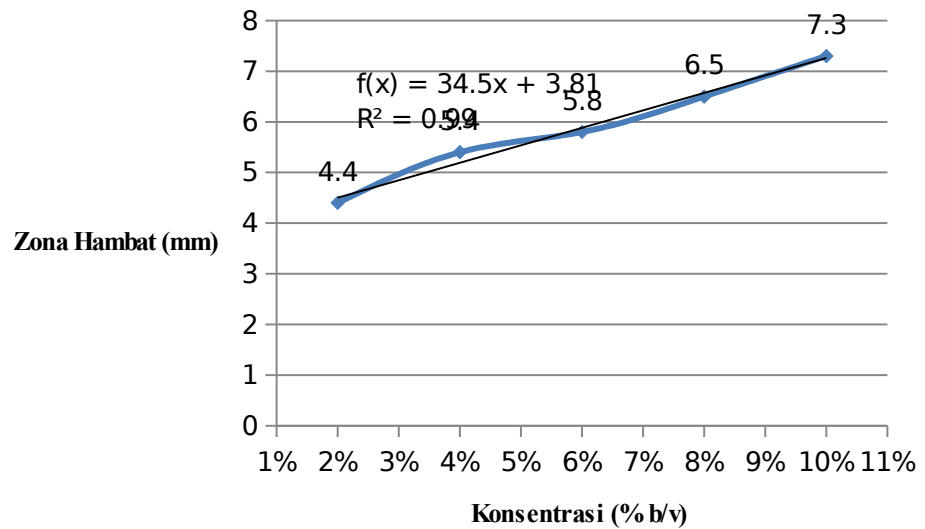
rentan terhadap zat kimia yang dapat menurunkan tegangan permukaan. Kerusakan membran sel menyebabkan terganggunya transport nutrisi (senyawa dan ion) sehingga sel bakteri mengalami kekurangan nutrisi yang diperlukan bagi pertumbuhannya (Handrianto, 2016). Berdasarkan mekanisme kerja antimikroba diantaranya adalah mengganggu metabolisme sel mikroba, menghambat dinding sel mikroba, mengganggu permeabilitas membran sel mikroba, menghambat sintesis protein sel mikroba, dan menghambat sintesis atau merusak asam nukleat sel mikroba. Sedangkan tanin sebagai antimikroba bekerja dengan cara merusak membran sel yang menyebabkan intraseluler. Akibat terganggunya permeabilitas dan rusaknya fungsi integritas membran sitoplasma, sel tidak dapat melakukan aktivitas hidup sehingga pertumbuhannya terhambat (Smullen, 2007 dalam Andhida, 2015). Hal ini dapat dikatakan bahwa senyawa tanin dapat menghambat pertumbuhan bakteri.

Terhambatnya pertumbuhan bakteri ditandai dengan adanya zona bening pada media agar. Berdasarkan data hasil penelitian yang telah dilakukan, ekstrak daun pepaya (*Carica papaya L.*) menghasilkan zona hambat yang berbeda pada tiap konsentrasinya.

Berdasarkan penelitian yang dilakukan, maka diperoleh nilai rata – rata zona hambat yang terbentuk. Pada konsentrasi 2% zona hambat yang terbentuk sebesar 4,4 mm. Pada konsentrasi 4% zona hambat yang terbentuk 5,4 mm. Pada konsentrasi 6 % zona hambat yang terbentuk 5,8 mm. Pada konsentrasi 8% zona hambat yang terbentuk 6,6 mm. Pada konsentrasi 10 % zona hambat yang terbentuk sebesar 7,3 mm. Berdasarkan hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstrak daun pepaya (*Carica papaya L.*) dapat menghambat pertumbuhan bakteri *Bacillus subtilis* Hal ini didukung dengan adanya uji anova *one way*.

Berdasarkan hasil uji Anova *one way* yang telah dilakukan diperoleh nilai $\text{sig}=0.000$, jika diperoleh nilai $\text{sig} < 0.05$ maka H_0 (tidak terdapat zona hambat) ditolak dan H_1 (terdapat zona hambat) diterima. Dapat diartikan bahwa terdapat perbedaan zona hambat yang terbentuk terhadap berbagai konsentrasi ekstrak daun pepaya. Hasil data yang telah diuji dengan menggunakan Anova *one way*, maka dapat dilanjutkan pada pengujian selanjutnya yaitu Uji Duncan

Hasil data yang telah dilakukan menggunakan uji Anova *One way*, maka dilakukan pengujian selanjutnya yaitu pengujian BNT dengan uji Duncan's. Uji Duncan digunakan untuk menguji perbedaan di antara semua perlakuan tanpa memperhatikan jumlah perlakuan (Tapehe, 2015). Hasil uji Duncan menunjukkan bahwa terdapat perbedaan yang signifikan dari masing – masing konsentrasi.



Untuk mengetahui konsentrasi yang aktif dalam menghambat bakteri *Bacillus subtilis* dapat dilihat menggunakan persamaan garis linier pada gambar dibawah ini

Gambar 1. Kurva Uji Pengaruh Konsentrasi Ekstrak Daun Pepaya

Dilihat dari Kurva hasil pengamatan antara pengaruh konsentrasi dan zona hambat ekstrak daun pepaya terhadap bakteri *Bacillus subtilis* didapatkan nilai r yaitu 0,989. Hal ini menunjukkan bahwa hasil tersebut memiliki garis yang linier. Dari kurva tersebut menunjukkan bahwa semakin tinggi konsentrasi maka zona hambat yang terbentuk akan semakin besar.

SIMPULAN

Penelitian ini menyimpulkan bahwa ekstrak daun pepaya (*Carica papaya L.*) pelarut etanol 96% dengan metode bioautografi memiliki aktivitas antibakteri terhadap bakteri *Bacillus subtilis* dengan konsentrasi terendah 2% terbentuk zona hambat sebesar 4,4 mm dan konsentrasi tertinggi 10 % terbentuk zona hambat sebesar 7,4 mm. Dan zona hambat yang terbentuk terdapat pada Rf 0,93 yang diduga senyawa tersebut adalah senyawa tanin.

RUJUKAN

- Anhdida, K. Y. 2015. Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Daun *Garcinia benthami* Pierre Terhadap Beberapa Bakteri Patogen Dengan Metode Bioautografi. **Skripsi**. Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Program Studi Farmasi, Jakarta
- Anggrahini, D. N , Roza, R. M., & Fatmawati. 2013. Aktivitas Antibakteri Ekstrak Daun Pepaya (*Carica papaya L.*) Terhadap *Escherichia coli* dan *Samnonella typhi*. **Karya Ilmiah**. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Riau Kampus Bina Widya Pekanbaru, Indonesia.
- Handrianto, P. 2016. Uji Antibakteri Ekstrak Jahe Merah *Zingiber officinale var. Rubrum* Terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*. **Journal of Research and Technologies**. Vol. 2. Akademi Farmasi Surabaya, Surabaya.
- Harbone, J.B., (1987) . **Metode Fitokimia**. Ed II. Bandung:ITB
- Ismunandar, W. 2008. Potensi Antibakteri Kulit dan Daun Tanaman Akway (*Drymis sp*) Dari Papua. **Skripsi**. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- Mukholifah. (2014). Identifikasi Senyawa Tanin dan Penentuan Eluen Terbaik dari Etanol 70% Daun Pepaya (*Carica papaya*) dengan Metode

Kromatografi Lapis Tipis. **Karya Ilmiah**. Fakultas Sains dan teknologi UIN Maulana Malik Ibrahim Malang, Malang.

- Prabowo, A. C. 2015 Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Daun Pacar Air (*impatiens balsamina* L.) Terhadap Bakteri *Bacillus subtilis* dan *escherichia coli* Serta Bioautografinya. **Skripsi**. Fakultas Farmasi Universitas Muhammadiyah, Surakarta.
- Pratiwi, E. W, Prahani, D , Arina, Y. M. 2015. Daya Hambat Ekstrak Daun Pepaya (*Carica papaya* L.) Terhadap Adhesi Bakteri *Porphyromonas gingivalis* pada Neutrofil (*Inhibition of Papaya (Carica papaya L.) Leaves Extract on Adhesion of Porphyromonas gingivalis Bacterianto Neutrophils*). **e-Jurnal Pustaka Kesehatan**. Vol. 3 (No.2). Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember, Jember.
- Soranta, E. W. 2009. Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Daun Pepaya (*Carica papaya* L) Terhadap *Escherichia coli* Dan *Staphylococcus aureus* Multiresisten Antibiotik. **Skripsi**. Fakultas Farmasi Universitas Muhammadiyah, Surakarta.
- Tapehe, Y., (2015). **Statistika dan Rancangan Percobaan**. Jakarta: Buku Kedokteran EGC.
- Yulianti, N. F. (2013). Aktivitas Antibakteri dan Bioautografi Fraksi Etil Asetat Ekstrak Aseton Kulit Buah Kakao (*Theobroma cacao* L.) Terhadap *Streptococcus mutans* dan *Bacillus subtilis*. **Skripsi**. Fakultas Farmasi Universitas Muhammadiyah, Surakarta.