

UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI EKSTRAK DAN SUBFRAKSI DAUN PEPAYA (*CARICA PAPAYA L.*) TERHADAP BAKTERI PENYEBAB JERAWAT

Rika Hartati*, Lina Afriani, Komar Ruslan Wirasutisna

Informasi Penulis

Program Studi Sains dan Teknologi, Sekolah Farmasi, Institut Teknologi Bandung, Jl. Ganesa no.10 Bandung

*Korespondensi

Rika Hartati
Email: rika@itb.ac.id

ABSTRAK

Propionibacterium acne dan *Staphylococcus epidermidis* merupakan bakteri utama penginfeksi kulit yang dapat menyebabkan beberapa masalah kulit, salah satunya adalah jerawat. Daun pepaya merupakan salah satu tumbuhan yang mengandung berbagai senyawa yang memiliki banyak aktivitas, salah satunya adalah aktivitas antibakteri. Dalam penggunaan tradisional, daun pepaya digunakan dalam pengobatan jerawat. Pada penelitian ini dilakukan pengujian aktivitas antibakteri dari ekstrak n-heksana, etil asetat, dan etanol daun pepaya terhadap dua bakteri penyebab jerawat yaitu *Propionibacterium acne* dan *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 dengan menggunakan metode cakram difusi agar, metode mikrodilusi untuk menentukan konsentrasi hambat minimum (KHM), dan uji biotografi. Hasil uji pendahuluan dengan cakram difusi agar menunjukkan bahwa pada konsentrasi 5% ekstrak n-heksana daun pepaya menghasilkan diameter hambat paling besar pada kedua bakteri uji yaitu sebesar 7,43 mm untuk *Propionibacterium acne* dan 7,78 mm untuk *Staphylococcus epidermidis*. Hasil uji mikrodilusi ekstrak n-heksana pada kedua bakteri menghasilkan konsentrasi hambat minimum (KHM) >4096 µg/mL. Hasil pengujian biotografi ekstrak n-heksana menunjukkan adanya zona hambat pada Rf 0,09-0,28 dan 0,63 dalam pengembang kloroform-n-heksana (6:3) untuk bakteri *Propionibacterium acne*. Berdasarkan hasil ketiga uji, ekstrak n-heksana dilanjutkan ke tahap fraksinasi dengan metode kromatotron dan dipilih senyawa pada Rf 0,27 sebagai senyawa target. Fraksi dipantau menggunakan kromatografi lapis tipis (KLT) dan fraksi yang mengandung senyawa aktif dilanjutkan pada tahap subfraksinasi dengan metode kromatografi lapis tipis preparatif. Subfraksi diuji terhadap bakteri uji dengan metode uji biotografi dan diperoleh hasil pada konsentrasi uji 600 µg/mL dihasilkan zona hambat pada Rf 0,25-0,27 pada bakteri *Staphylococcus epidermidis* dan Rf 0,27 pada bakteri *Propionibacterium acne*. Berdasarkan hasil karakterisasi subfraksi ekstrak n-heksana daun pepaya dengan menggunakan penampak bercak spesifik diduga senyawa yang terdapat dalam subfraksi merupakan golongan steroid/triterpenoid.

Kata kunci: antibakteri, jerawat, daun pepaya, *Carica papaya L.*, biotografi

ANTIBACTERIAL ACTIVITY TEST OF PAPAYA (*CARICA PAPAYA L.*) LEAF EXTRACT AND SUBFRACTIONS AGAINST ACNE-CAUSING BACTERIA

ABSTRACT

Propionibacterium acne and *Staphylococcus epidermidis* are the major bacteria that infect skin which can cause many disease in the skin, one of them is acne. Papaya is one of the plants that has many activities, such as antibacterial activity. In traditional use, papaya leaves are used for treatment of acne. In this study, the antibacterial activity of n-hexane, ethyl acetate, and ethanol extracts of papaya leaves were tested against *P. acne* and *S. epidermidis* ATCC 12228 using agar diffusion disc method, microdilution method to determine minimum inhibitory concentration (MIC), and bioautography. The preliminary result with diffusion disc showed that at a concentration of 5% the n-hexane extract produced the largest inhibitory zone for both bacteria, 7,43 mm for *P. acne* and 7,78 mm for *S. epidermidis*. The result showed that the MIC of n-hexane extract was >4096 µg/mL. The result of the bioautography of n-hexane extract showed the inhibition zone at Rf 0,09-0,28 and Rf 0,63 in chloroform-n-hexane system (6:3) for *P. acne*. Based on the test result, the n-hexane extract was continued to the fractionation stage by chromatotron and the compound obtained at Rf 0,27 was selected as the target. The fraction was monitored by thin-layer chromatography (TLC) and the fraction contained the active compound was continued to subfractionation stage by preparative chromatography. The subfraction at a concentration of 600 µg/mL was tested against *P. acne* and *S. epidermidis* by bioautography. The results showed inhibitory zones at Rf 0,25-0,27 for *S. epidermidis* and Rf 0,27 for *P. acne*. Based on the result of characterization of the n-hexane subfraction by specific visualization reagent, the subfraction was predicted to contain steroid/triterpenoid compound.

Keywords: antibacterial, acne, papaya leaves, *Carica papaya L.*, bioautography

PENDAHULUAN

Acne vulgaris atau lebih dikenal sebagai jerawat merupakan suatu peradangan yang terjadi pada folikel pilosebacea yang utamanya disebabkan karena peningkatan sekresi sebum dan penyumbatan folikel (Well 2014). *Acne vulgaris* merupakan peradangan yang paling umum terjadi dan sering dialami oleh manusia. Berbagai macam jenis *acne* dapat menyerang manusia dari berbagai usia dimana prevalensi paling tinggi diderita oleh remaja terutama pada masa pubertas (Dhillon dan Varshney 2013). Hampir 90% remaja memiliki jerawat dan setengah dari mereka terus mengalami gejala hingga dewasa. Penelitian terbaru menunjukkan terjadi peningkatan prevalensi *acne vulgaris* pada anak-anak yang diduga karena terjadinya peningkatan onset pubertas (Dawson dan Dellavalle 2013).

Acne atau jerawat merupakan penyakit multifaktorial yang faktor penyebabnya dapat berasal dari faktor internal ataupun faktor eksternal. Patofisiologi dari *acne vulgaris* terdiri dari empat faktor yang saling berhubungan, yaitu hiperkeratinisasi, peningkatan produksi sebum, kolonisasi bakteri, dan inflamasi (Dawson dan Dellavalle 2013). *Propionibacterium acne* merupakan bakteri Gram-positif dan anaerob yang merupakan flora normal kelenjar pilosebacea. Pada penderita *acne vulgaris*, konsentrasi *Propionibacterium acne* lebih tinggi dibandingkan pada individu yang tidak menderita *Acne vulgaris*. Kolonisasi bakteri ini dapat memicu terjadinya inflamasi (Movita, 2013). Selain *Propionibacterium acne*, timbulnya jerawat juga dapat disebabkan oleh bakteri lainnya, yaitu *Staphylococcus epidermidis* (Rajiv et.al 2013).

Indonesia merupakan negara yang memiliki keanekaragaman tumbuhan yang banyak, dimana sekitar 30.000 jenis tumbuhan berbunga atau setara dengan 10% flora di dunia tumbuh di Indonesia (Kartawinata 2010). Banyaknya jenis flora tersebut kemudian banyak dimanfaatkan dalam bidang pengobatan, khususnya pengobatan tradisional. Secara tradisional, pengobatan dan pencegahan terhadap timbulnya jerawat dilakukan dengan menggunakan bahan alam. Salah satu diantaranya adalah dengan menggunakan daun pepaya (*Carica papaya* L.) (S Thomas 2012).

Berdasarkan penelitian diketahui bahwa daun pepaya memiliki aktivitas antibakteri terhadap beberapa bakteri patogen diantaranya adalah *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Streptococcus pneumonia*, *Salmonella typhi*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Shigella dysenteria*, *Serratia marcescens*, *Bacillus cereus*, *Pseudomonas fluorescens*, *Proteus vulgaris*, *Listeria monocytogenes*, dan *Bacillus stearothermophilus* (Peter et.al 2014). Penggunaan daun pepaya secara tradisional untuk jerawat serta penelitian-penelitian mengenai aktivitas antibakteri tersebut mendorong penulis untuk melakukan penelitian aktivitas antibakteri pada jenis bakteri penyebab jerawat.

Penelitian ini bertujuan untuk menguji aktivitas antibakteri dari ekstrak dan subfraksi daun pepaya (*Carica papaya* L.) terhadap dua bakteri uji penyebab jerawat yaitu *P. acne* dan *S. epidermidis* dengan menggunakan metode mikrodilusi untuk penentuan nilai konsentrasi hambat minimum dan metode biootografi sebagai panduan untuk pemisahan komponen ekstrak (isolasi).

METODE PENELITIAN

Karakterisasi simplisia

Karakterisasi simplisia meliputi pemeriksaan makroskopik, pemeriksaan mikroskopik, penetapan kadar air, penetapan kadar sari larut air, penetapan kadar sari larut etanol, penetapan kadar abu total, penetapan kadar abu larut air, penetapan kadar abu tidak larut asam, dan penetapan susut pengeringan sesuai metode yang direkomendasikan WHO (2011) dan Farmakope Herbal Indonesia. Pemeriksaan kandungan kimia dalam simplisia dilakukan dengan cara penapisan fitokimia meliputi pemeriksaan golongan alkaloid, flavonoid, fenol, saponin, tannin, kuinon, dan steroid/triterpenoid mengacu pada skrining fitokimia oleh Farnsworth N, (1966).

Pembuatan ekstrak

Pembuatan ekstrak dilakukan dengan metode ekstraksi panas yaitu dengan menggunakan refluks dengan ekstraksi bertingkat menggunakan pelarut n-heksana, etil asetat, dan etanol. Ekstrak yang diperoleh dipekatkan dengan *rotary evaporator* hingga diperoleh ekstrak kental. Ekstrak yang diperoleh dikarakterisasi meliputi penentuan

rendemen, bobot jenis, pola kromatografi, dan penapisan fitokimia ekstrak sehingga diperoleh ekstrak yang terkarakterisasi.

Uji Aktivitas Antibakteri

Persiapan uji aktivitas antibakteri diawali dengan melakukan penyiapan alat dan bahan, pembuatan media tumbuh bakteri, dan penyiapan bakteri uji. Alat dan bahan yang digunakan dalam proses uji aktivitas antibakteri sebelumnya disterilisasikan terlebih dahulu dengan menggunakan otoklaf dan oven. Setelah alat, bahan, ekstrak, serta bakteri uji telah siap maka dilakukan uji aktivitas antibakteri pada masing-masing ekstrak. Uji aktivitas antibakteri ini meliputi uji pendahuluan, penentuan nilai KHM, serta uji biootografi. Uji pendahuluan dilakukan dengan metode cakram difusi agar untuk menentukan keberadaan aktivitas antibakteri pada ekstrak.

Konsentrasi hambat minimum

Konsentrasi hambat minimum adalah konsentrasi terkecil ekstrak yang dapat menghambat pertumbuhan mikroba uji. Penetapan konsentrasi hambat minimum (KHM) pada ekstrak dilakukan secara *in vitro* dengan metode mikrodilusi. Penentuan nilai KHM dengan metode mikrodilusi dilakukan dengan menggunakan 96-microwell-round-bottomed plates. Kemampuan penghambatan pertumbuhan bakteri ditandai dengan tidak terbentuknya endapan pada dasar kolom *microwell-plates* (CLSI 2004).

Pengujian KHM dilakukan juga terhadap antibiotik pembanding yaitu tetrasiklin HCl yang merupakan antibiotik dengan spektrum luas terhadap bakteri Gram-positif dan bakteri Gram-negatif. Uji biootografi dilakukan dengan cara menempelkan plat kromatogram ekstrak di atas media agar padat yang telah diinokulasikan bakteri uji di dalam cawan petri. Selanjutnya diamati diameter hambat yang dihasilkan yang ditandai dengan munculnya zona bening pada media agar.

Pada masing-masing ekstrak selanjutnya dilakukan pemantauan ekstrak dengan menggunakan kromatografi lapis tipis dengan pengembang yang sesuai dan pengujian aktivitas antibakteri dari masing-masing ekstrak dengan menggunakan metode KLT biootografi yang diadopsi dari metode biootografi yang

dikembangkan oleh Choma IM dan Grzelak EM (2010). Ekstrak yang menghasilkan zona hambat paling besar berdasarkan uji biootografi dilanjutkan pada tahap fraksinasi.

Fraksinasi

Fraksinasi dilakukan dengan menggunakan kromatografi sentrifuga (kromatotron) kemudian fraksi yang diperoleh dipantau dengan menggunakan KLT. Fraksi yang mengandung senyawa yang memiliki nilai Rf yang sesuai dengan Rf pada uji biootografi ekstrak disatukan berdasarkan hasil pemantauan fraksi yang disemprot dengan penampak bercak universal H₂SO₄ 10% dalam metanol kemudian dipekatkan hingga diperoleh fraksi kental. Fraksi yang diperoleh dilanjutkan pada tahap subfraksinasi dengan menggunakan kromatografi lapis tipis (KLT) preparatif dan dipantau dengan KLT. Subfraksi yang diperoleh di uji aktivitasnya terhadap *P. acne* dan *S. epidermidis* dan di karakterisasi dengan menggunakan penampak bercak spesifik untuk mengetahui golongan senyawa yang terkandung di dalam subfraksi tersebut.

HASIL PERCOBAAN DAN PEMBAHASAN

Hasil Determinasi dan Penyiapan Bahan Uji

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu daun pepaya (*Carica papaya* L.) yang diperoleh dari Perkebunan Panglejar, Rajamandala, Cianjur, Jawa Barat. Determinasi daun pepaya yang digunakan dalam penelitian dilakukan di Herbarium Bandungense Sekolah Ilmu dan Teknologi Hayati (SITH) Institut Teknologi Bandung. Hasil determinasi menunjukkan bahwa tanaman yang digunakan dalam penelitian merupakan tumbuhan *Carica papaya* L. 'Calina' (pepaya).

Daun yang diperoleh dibersihkan, disortir, dirajang, dan kemudian dikeringkan di dalam oven. Setelah daun pepaya kering dilakukan proses penggilingan hingga diperoleh serbuk simplisia daun pepaya.

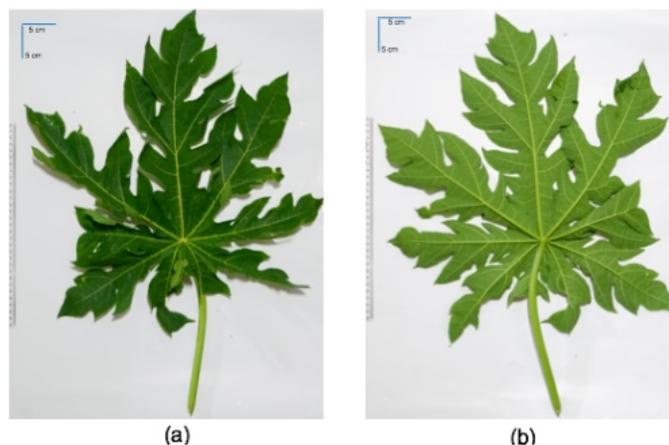
Karakterisasi Simplisia Daun Pepaya (*Carica papaya* L.)

Karakterisasi simplisia yang dilakukan meliputi pemeriksaan makroskopik dan mikroskopik simplisia, penetapan kadar abu total, kadar abu

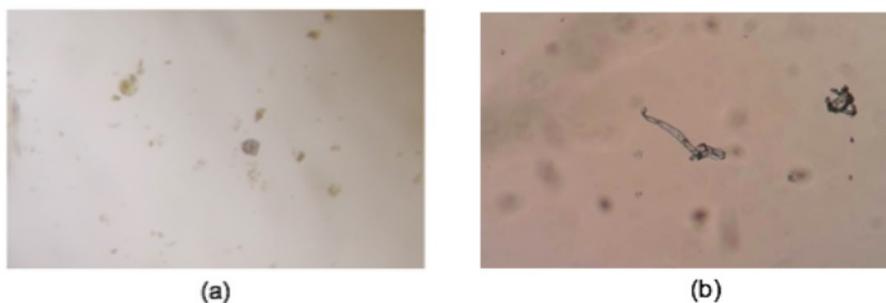
Hartati, dkk.

larut air, kadar abu tidak larut asam, kadar sari larut etanol, kadar sari larut air, susut pengeringan, kadar air, serta penapisan fitokimia. Hasil pemeriksaan makroskopik daun pepaya dapat dilihat pada Gambar 1. Pemeriksaan mikroskopik serbuk simplisia daun pepaya dilakukan dengan menggunakan reagen kloralhidrat 10% di bawah

mikroskop dengan perbesaran 100x. Berdasarkan hasil pemeriksaan, terlihat bahwa serbuk simplisia daun pepaya memiliki hablur kalsium oksalat dan rambut penutup yang khas. Hasil pemeriksaan mikroskopik serbuk simplisia daun pepaya dapat dilihat pada Gambar 2.



Gambar 1 Karakteristik makroskopik daun pepaya, (a) tampak depan, (b) tampak belakang.



Gambar 2 Karakteristik mikroskopik daun pepaya dengan reagen kloralhidrat 10% perbesaran 100x, (a) hablur kalsium oksalat, (b) rambut penutup.

Tabel 1 Hasil Karakterisasi Mutu Simplisia Daun Pepaya

| Parameter | Hasil (%b/b) |
|----------------------------|---------------|
| Kadar abu total | 11,01 ± 0,54 |
| Kadar abu tidak larut asam | 10,10 ± 1,35 |
| Kadar abu larut air | 3,06 ± 0,43 |
| Kadar sari larut air | 21,49 ± 4,40 |
| Kadar sari larut etanol | 29,31 ± 2,03 |
| Susut pengeringan | 8,94 ± 0,38 |
| Kadar air | 4,98 ± 0,005* |

Keterangan:

Pengerjaan dilakukan secara triplo

* = %v/b

Tabel 2 Hasil Penapisan Fitokimia Simplisia Daun Pepaya

| Pemeriksaan Golongan | Hasil |
|----------------------|-------|
| Alkaloid | - |
| Fenol | + |
| Flavonoid | + |
| Kuinon | - |
| Saponin | - |
| Steroid/triterpenoid | + |
| Tanin galat | - |
| Tanin katekat | - |

Keterangan:

+ = terdeteksi adanya senyawa golongan tersebut = tidak terdeteksi adanya senyawa golongan tersebut

Ekstraksi Simplisia Daun Pepaya dan Karakterisasi Ekstrak Daun Pepaya (*Carica papaya* L.)

Proses ekstraksi simplisia daun pepaya dilakukan dengan menggunakan metode refluks bertingkat dimulai dari pelarut yang non polar ke pelarut yang lebih polar yaitu n-heksana, etil asetat, kemudian etanol dengan pengulangan ekstraksi pada masing-masing pelarut sebanyak tiga kali. Metode refluks ini memerlukan jumlah pelarut yang cukup banyak karena dalam proses ekstraksi perlu dilakukan penggantian pelarut yang telah jenuh. Ekstrak yang diperoleh dari masing-masing pelarut kemudian disaring dan dipisahkan menggunakan *rotary evaporator* sehingga diperoleh ekstrak kental dari masing-masing pelarut. Ekstrak kental yang diperoleh selanjutnya dikarakterisasi. Hasil dari karakterisasi ekstrak daun pepaya dapat dilihat pada Tabel 3 dan Tabel 4.

Berdasarkan hasil penapisan fitokimia ekstrak kental daun pepaya dengan pelarut n-heksana, etil asetat, dan etanol diperoleh bahwa ekstrak kental n-heksana dan etil asetat daun pepaya mengandung senyawa golongan flavonoid dan steroid/triterpenoid, sedangkan ekstrak kental etanol daun pepaya mengandung senyawa golongan flavonoid, steroid/triterpenoid, dan fenol.

Penentuan profil kromatogram ekstrak dilakukan untuk melihat penyebaran senyawa dalam ekstrak. Penentuan profil kromatogram dari masing-masing ekstrak daun pepaya dilakukan pemantauan ekstrak dengan menggunakan metode kromatografi lapis tipis (KLT) dengan fase diam silika gel GF₂₅₄ yang diamati dibawah sinar tampak, sinar UV λ 254 nm, sinar UV λ 366 nm, dan penampak bercak universal H₂SO₄ 10% dalam metanol.

Tabel 3 Rendemen Ekstrak Kental dan Bobot Jenis 5% Ekstrak Daun Pepaya

| Pelarut Ekstrak | Rendemen Ekstrak (%b/b) | Bobot Jenis 5% Ekstrak (kg/cm ³) |
|-----------------|-------------------------|--|
| n-heksana | 5,47 % | 0,69 ± 0,004 |
| Etil asetat | 2,86 % | 0,90 ± 0,007 |
| Etanol | 7,95% | 0,82 ± 0,002 |

Keterangan:

Pengerjaan bobot jenis 5% ekstrak dilakukan secara triplo

Hartati, dkk.

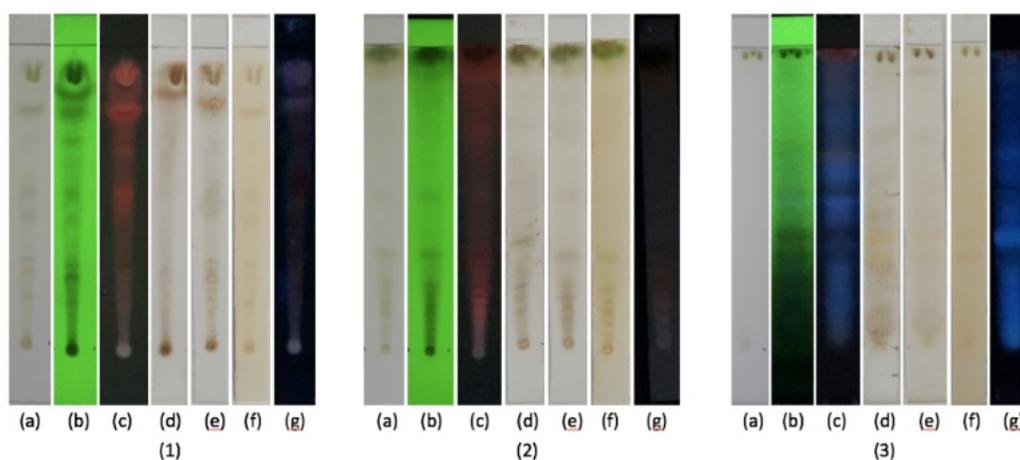
Tabel 4 Hasil Penapisan Fitokimia Ekstrak Daun Pepaya

| Pemeriksaan Golongan | Hasil Pemeriksaan Ekstrak Kental | | |
|----------------------|----------------------------------|-------------|--------|
| | n-heksana | Etil Asetat | Etanol |
| Alkaloid | - | - | - |
| Fenol | - | - | + |
| Flavonoid | + | + | + |
| Kuinon | - | - | - |
| Saponin | - | - | - |
| Steroid/triterpenoid | + | + | + |
| Tanin galat | - | - | - |
| Tanin katekat | - | - | - |

Keterangan:

+ = terdeteksi adanya senyawa golongan tersebut

= tidak terdeteksi adanya senyawa golongan tersebut



Gambar 3 Pola kromatografi ekstrak daun pepaya (*Carica papaya* L.) menggunakan kromatografi lapis tipis (KLT) dengan fase diam silika gel GF₂₅₄ (1) ekstrak n-heksana dengan fase gerak kloroform-n-heksana (6:3), (2) ekstrak etil asetat dengan fase gerak toluena-etil asetat (6:1), (3) ekstrak etanol dengan fase gerak etil asetat-asam asetat-asam format-air (9:1:1:2), (a) dibawah sinar tampak, (b) dibawah sinar UV λ 254 nm, (c) dibawah sinar UV λ 366 nm, (d) penampak bercak universal H₂SO₄ 10% dalam metanol, (e) penampak bercak anisaldehyd, (f) penampak bercak FeCl₃, (g) penampak bercak sitroborat dibawah sinar UV λ 366 nm.

Fase gerak yang digunakan ekstrak n-heksana yaitu kloroform-n-heksana (6:3), ekstrak etil asetat yaitu toluena-etil asetat (6:1), dan ekstrak etanol yaitu etil asetat-asam asetat-asam format-air (9:1:1:2). Hasil kromatogram dari masing-masing ekstrak yang diperoleh dapat berdasarkan hasil pengamatan bakteri *P. acne* dan *S. epidermidis* menghasilkan warna ungu setelah dilakukan pewarnaan gram yang berarti kedua bakteri tersebut merupakan bakteri Gram-positif. Pengamatan bentuk koloni bakteri uji dilakukan dengan menggunakan mikroskop dengan perbesaran 100x.

Berdasarkan hasil pengamatan terlihat bahwa bakteri *P. acne* memiliki bentuk koloni basil seperti tabung, sedangkan bakteri *S. epidermidis* memiliki bentuk koloni kokus (bulat) dilihat pada Gambar 3.

Berdasarkan hasil penapisan fitokimia ekstrak kental daun pepaya dengan pelarut n-heksana, etil asetat, dan etanol diperoleh bahwa ekstrak kental n-heksana dan etil asetat daun pepaya mengandung senyawa golongan flavonoid dan steroid/triterpenoid, sedangkan ekstrak kental etanol daun pepaya mengandung senyawa golongan flavonoid, steroid/triterpenoid, dan

fenol. Penentuan profil kromatogram ekstrak dilakukan untuk melihat penyebaran senyawa dalam ekstrak.

Penentuan profil kromatogram dari masing-masing ekstrak daun pepaya dilakukan pemantauan ekstrak dengan menggunakan metode kromatografi lapis tipis (KLT) dengan fase diam silika gel GF₂₅₄ yang diamati dibawah sinar tampak, sinar UV λ 254 nm, sinar UV λ 366 nm, dan penampak bercak universal H₂SO₄ 10% dalam metanol. Fase gerak yang digunakan ekstrak n-heksana yaitu kloroform-n-heksana (6:3), ekstrak etil asetat yaitu toluena-etil asetat (6:1), dan ekstrak etanol yaitu etil asetat-asam asetat-asam format-air (9:1:1:2). Hasil kromatogram dari masing-masing ekstrak yang diperoleh dapat dilihat pada Gambar 3.

Identifikasi Bakteri Uji

Bakteri uji yang digunakan dalam penelitian ini merupakan bakteri yang berperan dalam timbulnya masalah di kulit terutama jerawat, yaitu *Propionibacterium acne* dan *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Farmasi, Sekolah Farmasi Institut Teknologi Bandung. Sebelum dilakukan proses pengujian ekstrak terlebih dahulu dilakukan identifikasi bakteri untuk memeriksa kebenaran bakteri uji yang digunakan.

Pada penelitian ini dilakukan identifikasi bakteri uji menggunakan metode pewarnaan gram dan pengamatan bentuk koloni dari bakteri uji di bawah mikroskop dengan perbesaran 100x. *P. acne* merupakan bakteri anaerob, Gram-positif yang memiliki bentuk basil (*bacillus gram positive*) (Sowmiya, 2015), sedangkan *S. epidermidis* merupakan bakteri Gram-positif yang memiliki bentuk kokus dengan koloni berbentuk anggur (Zhang et.al 2003). Hasil identifikasi dari kedua bakteri uji dapat dilihat pada Gambar 4.

Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak

Ketiga ekstrak daun pepaya yang diperoleh selanjutnya dipantau berdasarkan aktivitas antibakteri terhadap dua bakteri uji yaitu *P. acne* dan *S. epidermidis*. Pengujian aktivitas antibakteri pada ekstrak daun pepaya dilakukan dengan tiga metode yaitu uji pendahuluan, penentuan

konsentrasi hambat minimum (KHM), dan uji biootografi.

SKRINING AKTIVITAS ANTIBAKTERI EKSTRAK DAUN

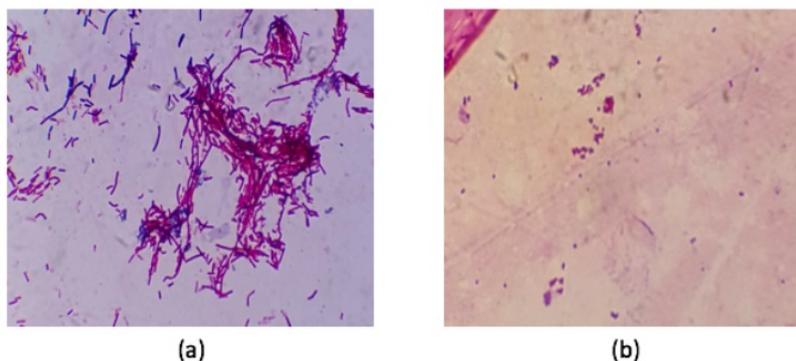
Pepaya

Uji aktivitas antibakteri daun pepaya diawali dengan uji pendahuluan pada ketiga ekstrak daun pepaya dengan menggunakan metode difusi agar. Pada uji pendahuluan digunakan suspensi bakteri uji yaitu *P. acne* dan *S. epidermidis* yang setara dengan 5×10^6 CFU/mL. Dari masing-masing suspensi bakteri tersebut diambil sebanyak 200 μ L suspensi bakteri kemudian dimasukkan ke dalam media Mueller Hinton Agar (MHA) yang sudah padat di dalam cawan petri dan diratakan dengan menggunakan spreader. Sampel ekstrak n-heksana, etil asetat, dan etanol yang digunakan dalam pengujian dibuat dalam tiga konsentrasi, yaitu 5%, 10%, dan 20%. Kontrol positif yang digunakan dalam pengujian ini adalah antibiotik tetrasiklin dengan konsentrasi 100 μ g/mL, sedangkan kontrol negatif yang digunakan adalah masing-masing pelarut yang digunakan dalam membuat larutan uji yaitu campuran DMSO 5%, Tween 1,5%, dan MHB untuk ekstrak n-heksana, DMSO 5%, Tween 2%, dan MHB untuk ekstrak etil asetat, dan DMSO 5% dan MHB untuk ekstrak etanol. Tetrasiklin dipilih sebagai kontrol positif karena antibiotik ini memiliki spektrum kerja yang luas dan aktif terhadap bakteri yang diujikan. Hasil uji pendahuluan dari ekstrak n-heksana, etil asetat, dan etanol daun pepaya dapat dilihat pada Tabel 5.

Penentuan Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) dengan Metode Mikrodilusi

Penentuan konsentrasi hambat minimum (KHM) ekstrak daun pepaya terhadap bakteri *P. acne* dan *S. epidermidis* dengan metode mikrodilusi menggunakan 96 *microwell plate*. Pada uji ini dilakukan pengenceran sampel uji sebanyak 9 kali dengan konsentrasi terendah 8 μ g/mL, dan konsentrasi tertinggi 4096 μ g/mL. Kontrol positif yang digunakan dalam pengujian ini adalah tetrasiklin dengan konsentrasi terendah 0,3125 μ g/mL dan konsentrasi tertinggi sebesar 160 μ g/mL, sedangkan kontrol negatif yang digunakan adalah media MHB. Hasil uji mikrodilusi yang diperoleh dapat dilihat pada Tabel 6.

Hartati, dkk.



Gambar 4 Karakteristik mikroskopik bakteri uji dengan perbesaran 100x, (a) *Propionibacterium acne*, (b) *Staphylococcus epidermidis*.

Tabel 5. Hasil Uji Pendahuluan Ekstrak n-Heksana, Ekstrak Etil Asetat, dan Ekstrak Etanol Daun Pepaya terhadap Bakteri Uji

| Sampel | Diameter Hambat Bakteri Uji (mm) | |
|-------------------------------|----------------------------------|-----------------------------------|
| | <i>Propionibacterium acne</i> | <i>Staphylococcus epidermidis</i> |
| Ekstrak n-heksana 5% (b/v) | 7,43 | 7,78 |
| Ekstrak n-heksana 10% (b/v) | 9,43 | 8,50 |
| Ekstrak n-heksana 20% (b/v) | 9,43 | 9,28 |
| Ekstrak etil asetat 5% (b/v) | - | 7,08 |
| Ekstrak etil asetat 10% (b/v) | - | 7,40 |
| Ekstrak etil asetat 20% (b/v) | 7,73 | 7,40 |
| Ekstrak etanol 5% (b/v) | 6,96 | 6,95 |
| Ekstrak etanol 10% (b/v) | 7,68 | 7,33 |
| Ekstrak etanol 20% (b/v) | 8,38 | 7,50 |
| Tetrasiklin 100 µg/mL | 10,75 | 8,93 |

Keterangan:

Pengerjaan bobot jenis ekstrak dan kadar air ekstrak dilakukan secara triplo

Uji Biotografi Ekstrak Daun Pepaya

Penentuan aktivitas antibakteri dari ekstrak daun pepaya dilanjutkan dengan melakukan uji biotografi dengan menggunakan KLT silika gel GF₂₅₄. Pengujian ini dilakukan untuk menentukan senyawa di dalam ekstrak yang memiliki aktivitas antibakteri pada bakteri uji. Pada pengujian ini, digunakan larutan ekstrak dengan konsentrasi 1%. Larutan uji yang telah dibuat ditotolkan pada pelat KLT kemudian dikembangkan dengan fasa gerak kloroform-n-heksana (6:3) dan dikeringkan. Selanjutnya pelat ditempelkan di atas media agar yang sudah diinokulasikan bakteri uji dan didiamkan selama 30 menit. Pelat KLT kemudian diangkat dari media agar dan selanjutnya diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Hasil uji biotografi pada ketiga ekstrak daun pepaya terhadap dua bakteri uji dapat dilihat pada Gambar

5. Hanya ekstrak n-heksana dan etil asetat pada bakteri uji *P. acne* yang menghasilkan diameter hambat. Pada ekstrak n-heksana terdapat diameter hambat pada Rf 0,09-0,25 dan Rf 0,67, sedangkan pada ekstrak etil asetat terdapat diameter hambat pada Rf 0,25. Dari keempat uji aktivitas antibakteri tiga ekstrak daun pepaya terhadap bakteri *P. acne* dan *S. epidermidis* yang telah dilakukan dipilih ekstrak n-heksana untuk dilanjutkan pada proses fraksinasi.

Pengendapan Klorofil

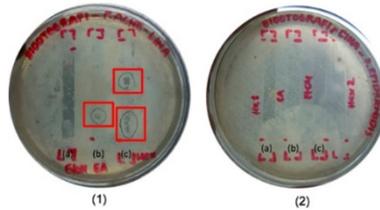
Pengendapan klorofil dilakukan untuk mengurangi jumlah klorofil yang terdapat pada ekstrak n-heksana daun pepaya sebelum ekstrak tersebut dilanjutkan ke tahap fraksinasi. Pengendapan klorofil dilakukan dengan cara melarutkan ekstrak n-heksana ke dalam campuran pelarut aseton-air

(8:2) kemudian dilakukan penyaringan hingga diperoleh residu dan filtrat. Filtrat yang dihasilkan kemudian dipekatkan dan dilakukan pemantauan

dengan menggunakan KLT GF254 yang dikembangkan dalam fase gerak kloroform-n-heksana (6:3).

Tabel 6. Nilai Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) Ekstrak Daun Pepaya dan Tetrasiklin HCL terhadap Bakteri Uji

| Bakteri Uji | Ekstrak n-heksana ($\mu\text{g/mL}$) | Ekstrak etil asetat ($\mu\text{g/mL}$) | Ekstrak Etanol ($\mu\text{g/mL}$) | Tetrasiklin HCl ($\mu\text{g/mL}$) |
|-----------------------|---|---|--|---|
| <i>P. acne</i> | > 4096 | > 4096 | > 4096 | 2,5 |
| <i>S. epidermidis</i> | > 4096 | > 4096 | > 4096 | 5 |

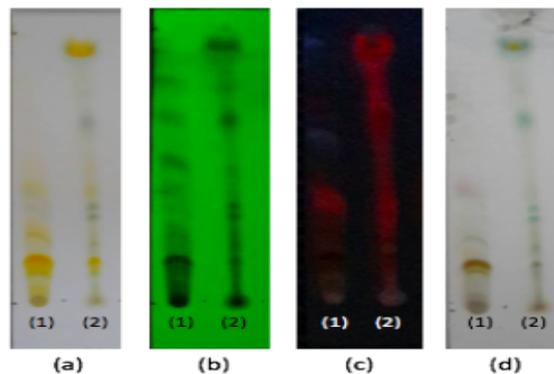


Gambar 5 Hasil uji biotografi ekstrak daun pepaya (*Carica papaya* L.) terhadap bakteri uji, (1) *Propionibacterium acne*, (2) *Staphylococcus epidermidis*, (a) Ekstrak n-heksana daun pepaya, (b) Ekstrak etil asetat daun pepaya, (c) Ekstrak etanol daun pepaya.

Fraksinasi dan Pemantauan Fraksi

Tahap fraksinasi dilakukan dengan menggunakan metode kromatografi lapis tipis sentrifuga (kromatotron) dengan elusi isokratik menggunakan komposisi eluen kloroform-n-heksana (6:3). Ekstrak n-heksana yang digunakan dalam proses fraksinasi adalah sebesar 300 mg. Dari hasil fraksinasi diperoleh 120 fraksi yang kemudian dipantau dengan menggunakan KLT Silika Gel GF₂₅₄ yang dikembangkan dalam fase gerak kloroform-n-heksana (6:3) dan dipantau di

bawah sinar tampak, sinar UV λ 254, sinar UV λ 366 nm, dan penampak bercak universal H₂SO₄ 10% dalam metanol. Berdasarkan hasil pemantauan tersebut diperoleh hasil bahwa senyawa yang memiliki aktivitas antibakteri di sekitar R_f 0,27 pada bakteri uji berdasarkan hasil uji biotografi terdapat pada fraksi 26-30. Fraksi 26-30 sebanyak 18,6 mg dikumpulkan dan dilanjutkan pada proses subfraksinasi. Hasil pemantauan fraksi ekstrak n-heksana daun pepaya dapat dilihat pada Gambar 7.



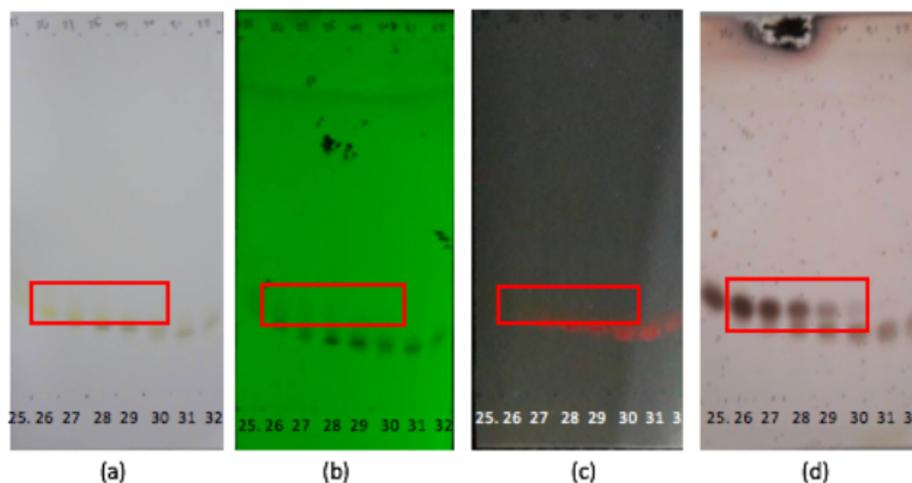
Gambar 6 Hasil pemantauan ekstrak n-heksana dan filtrat aseton-air (8:2) ekstrak n-heksana daun pepaya menggunakan kromatografi lapis tipis (KLT) dengan fase diam silika gel GF₂₅₄ dan fase gerak kloroform-n-heksana (6:3), (1) filtrat aseton-air (8:2), (2) ekstrak n-heksana, (a) dibawah sinar tampak, (b) dibawah sinar UV λ 254 nm, (c) dibawah sinar UV λ 366 nm, (d) penampak bercak universal H₂SO₄ 10% dalam metanol.

Hartati, dkk.

Subfraksinasi dan Pemantauan Subfraksi

Proses subfraksinasi dilakukan dengan menggunakan kromatografi lapis tipis (KLT) preparatif. Fraksi 26-30 dipekatkan kemudian ditotolkan pada pelat KLT preparatif membentuk pita sepanjang pelat. Pelat KLT tersebut kemudian dikembangkan dalam fase gerak kloroform-n-heksana (6:3). Senyawa target pada Rf 0,27 tidak berpendar pada saat diamati di bawah sinar UV λ 254 nm dan UV λ 366 nm sehingga dilakukan pemotongan pada ujung kanan dan kiri pelat KLT dan disemprot dengan penampak bercak universal H₂SO₄ 10% dalam metanol untuk digunakan sebagai patokan keberadaan senyawa target. Senyawa target kemudian dikerok dan dimaserasi dalam pelarut kloroform selama 24 jam. Hasil

maserasi disaring dan dipekatkan untuk selanjutnya dilakukan pemantauan subfraksi dengan menggunakan KLT GF254 yang dikembangkan dalam fase gerak kloroform-n-heksana (6:3). Berdasarkan hasil pemantauan subfraksi, dapat dilihat bahwa senyawa yang terkandung dalam subfraksi tidak terlihat di bawah sinar tampak dan tidak berpendar di bawah sinar UV λ 254 nm dan di bawah sinar UV λ 366 nm, sedangkan saat disemprot menggunakan penampak bercak H₂SO₄ 10% dalam metanol terlihat dua bercak pada Rf 0,25 dan Rf 0,27. Subfraksi yang diperoleh dari hasil subfraksinasi menggunakan kromatotron adalah sebesar 1,21 mg yang selanjutnya digunakan dalam uji aktivitas antibakteri dan karakterisasi subfraksi.



Gambar 7 Hasil pemantauan fraksi n-heksana daun pepaya menggunakan kromatografi lapis tipis (KLT) dengan fase diam silika gel GF₂₅₄ dan fase gerak kloroform-n-heksana (6:3), (1) dibawah sinar tampak, (2) dibawah sinar UV λ 254 nm, (3) dibawah sinar UV λ 366 nm, (4) penampak bercak universal H₂SO₄ 10% dalam metanol.

Uji Aktivitas Antibakteri Subfraksi Ekstrak n-Heksana Daun Pepaya (*Carica papaya* L.)

Uji aktivitas subfraksi dilakukan pada bakteri *P. acne* dan *S. epidermidis* menggunakan metode biotografi. Konsentrasi sampel uji yang digunakan adalah sebesar 600 μ g/mL. Larutan subfraksi tersebut ditotolkan pada KLT GF254 dan dikembangkan dengan menggunakan fase gerak kloroform-n-heksana (6:3). Hasil dari uji aktivitas subfraksi dengan metode biotografi dapat dilihat pada Gambar 5.10.

Pada bakteri *S. epidermidis* terdapat zona hambat yang cukup besar di sekitar Rf 0,25-0,27, sedangkan pada bakteri *P. acne* zona hambat yang terbentuk hanya satu titik kecil di Rf 0,27.

Karakterisasi Subfraksi Ekstrak n-Heksana Daun Pepaya (*Carica papaya* L.)

Berdasarkan hasil pemantauan bercak senyawa pada subfraksi tidak terlihat di bawah sinar tampak, sinar UV 254 dan sinar UV 366 nm. Saat disemprot dengan menggunakan penampak bercak, bercak senyawa terlihat pada hasil penyemprotan menggunakan penampak bercak

universal H₂SO₄ 10% dalam metanol dan penampak bercak spesifik anisaldehyd dan Liebermann Bouchard. Pada saat disemprot penampak bercak anisaldehyd dan Liebermann Bouchard, bercak menghasilkan warna merah keunguan sehingga diduga senyawa yang terkandung dalam subfraksi ekstrak n-heksana daun pepaya yang diperoleh merupakan senyawa golongan steroid/triterpenoid.

KESIMPULAN DAN SARAN

Kesimpulan

Didapatkan subfraksi daun pepaya (*Carica papaya* L.) dari ekstrak n-heksana yang mengandung dua senyawa yang memiliki aktivitas antibakteri. Hasil penapisan pada ekstrak n-heksana menunjukkan keberadaan golongan flavonoid dan steroid/triterpenoid. Uji mikrodilusi ekstrak n-heksana adalah >4096 µg/mL terhadap *P. acne* dan *S. epidermidis*. Uji biotografi pada ekstrak n-heksana menunjukkan zona hambat pada Rf 0,09-0,28 dan Rf 0,63 pada bakteri *P. acne*, sedangkan pada uji biotografi subfraksi ekstrak n-heksana menunjukkan zona hambat pada bakteri *P. acnes* di Rf 0,27 dan *S. epidermidis* di Rf 0,25- 0,27. Secara kualitatif dengan menggunakan penampak bercak spesifik, subfraksi dari ekstrak n-heksana daun pepaya yang memiliki aktivitas antibakteri pada *P. acne* dan *S. epidermidis* diduga merupakan senyawa golongan steroid/triterpenoid.

DAFTAR PUSTAKA

Aravind G, Debjit B, Duraivel S, Harish G, 2013, Traditional and medicinal uses of *Carica papaya*, *J Med Plants Stud* 1(1): 7-15.

Choma IM, Grzelak EM, 2010, Bioautography detection in thin-layer chromatography, *J Chromatogr* 1218(19): 2684-2691.

Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI), 2004, Method for dilution antimicrobial susceptibility test for bacteria that grow anaerobically, approved standard m11-a6 6th ed; National Committee for Clinical Laboratory Standards: Wayne, Philadelphia, PA, USA.

Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI), 2010, Method for dilution antimicrobial susceptibility test for bacteria that grow

anaerobically, approved standard m07-a8 8th ed; National Committee for Clinical Laboratory Standards: Wayne, Philadelphia, PA, USA.

Dawson AL, Dellavalle RP, 2013, *Acne vulgaris*, *BMJ*, 1-7.

Dhillon KS, Varshney KR. 2013, Study of microbiological spectrum in *acne vulgaris* : an in vitro study, *Sch J App Med Sci* 1(6): 724-727.

Farnsworth N, 1966, Biological and phytochemical screening of plants, *J Pharm Sci* 55(3): 225-276.

Kartawinata K, 2010, Dua abad mengungkap kekayaan flora dan ekosistem Indonesia, *LIPU*, 1-38.

Krishna KL, Paridhavi M, Patel JA, 2008, Review on nutritional, medicinal, and pharmacological properties of papaya (*Carica papaya* Linn.), *Natural Product Radiance* 7(4): 364-373.

Kulkarni N, Mandhanya M, Jain DK, 2011, Centrifugal thin layer chromatography, *Asian J Pharm Life Sci*1(3): 294-300.

Langfield RD, Scarano FJ, Heitzman ME, Kondo M, Hammond GB, Neto CC, 2004, Use a modified microplate bioassay method to investigate antibacterial activity in the peruvian medicinal plant *peperomia galioides*, *J Ethnopharmacol* 94: 279-281.

Mahendra CG, Nikhil DA, 2016, Nutricional, medicinal, and pharmacological properties of papaya (*Carica papaya* Linn.) : A Review, *J Innov Pharm and Biol Sci* 3(1): 162-169.

Movita, Theresia, 2013, *Acne vulgaris*, *Continuing Medical Education* 40(4): 269-272.

Peter JK, Kumar Y, Pander P, Masih H, 2014, Antibacterial activity of seed and leaf extract of *Carica Papaya* var *Pusa dwarf* Linn, *J Pharm Biol Sci* 9(2): 29-37.

Rajiv P, Nitesh K, Raj K, Hemant KG, 2013, *Staphylococcus epidermidis* in human skin microbiome associate with *acne* : a cause of disease or defence? *Res J of Biotechnol* 8(12): 78-82.

S Thomas AN, 2012, Tanaman obat tradisional 1, *Kanisius*, Yogyakarta 91.

Hartati, dkk.

Well D, 2014, Acne vulgaris : a review of causes and treatment options, J Nurse Pract 6(6): 302-309.

WHO, 2011, Quality control methods for herbal materials, World Health Organization Geneva, 29-35.

Zhang YQ, Ren SX, Li HL, Wang YX, Fu G, Yang J, Qin ZQ, Miao YG, Wang WY, Chen RS, Shen Y, Chen Z, Yuan ZH, Zhao GP, Qu D, Danchin A, Wen YM, 2003, Genome-based analysis of virulence genes in a non-biofilm-forming Staphylococcus epidermidis strain (ATCC 12228), Mol Microbio 49(6):1577-1593.