

Water Extract Activity of Papaya Leaf as Antibiofilm against *Escherichia coli*
(Aktivitas Ekstrak Air Daun Pepaya sebagai Antibiofilm terhadap *Escherichia coli*)
Livia Rhea Alvita¹, Syamsul Falah^{1*}, Novik Nurhidayat²

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

²*Center of Biology Research and Development, Indonesian Institute of Science, Cibinong, Bogor, 16911, Indonesia*

Received : 8 July 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

Biofilms are significant hazards in the food industry. The presence of Escherichia coli biofilms in food industry is potentially causing food spoilage that will shorten the shelf life as well as lead to the spread of disease through food. The purpose of this study is to determine the phytochemical compound of aqueous extract of papaya leaves and to determine its activity on inhibition of cell attachment and growth, and on degradation of the biofilm using Micro-titter Plate Biofilm Assay. The results phytochemical test showed that papaya leave extract contains alkaloid, tanin, flavonoid, and steroid and have anti-biofilm activity. Papaya leave extract with highest activity caused biofilm degradation of 48,99%. The optimum temperature of biofilm degradation (>52,5%) by papaya leaves extract was around 35°C - 40°C. The optimum contact time and extract concentration were 57-60 minutes and 75-100%, respectively.

Keywords: *biofilm, Carica papaya L, Escherichia coli, water extract*

ABSTRAK

Biofilm merupakan salah satu bahaya yang signifikan dalam industri makanan. Kehadiran biofilm dari Escherichia coli dalam industri pangan sangat berpotensi menimbulkan pembusukan makanan yang akan memperpendek masa simpan (shelf-life) maupun mengakibatkan penyebaran penyakit melalui makanan (foodborne disease). Tujuan dari penelitian ini untuk menentukan kandungan senyawa fitokimia dari ekstrak air daun pepaya dan untuk mengetahui aktivitas pencegahan perlekatan, penghambatan pertumbuhan dan pendegradasian biofilm menggunakan metode Microtiter Plate Biofilm Assay. Hasil fitokimia menunjukkan ekstrak daun pepaya mengandung alkaloid, flavonoid, tannin dan steroid yang diduga berperan dalam aktivitas antibiofilm. Ekstrak air daun

pepaya memiliki aktivitas tertinggi dalam pendegradasian biofilm sebesar 48.99%. Setelah dilakukan optimasi menggunakan metode Response Surface di dapat kondisi terbaik dalam pendegradasian biofilm oleh ekstrak daun pepaya (> 52.5%) yaitu pada kondisi suhu 35°C-40°C, waktu kontak 57-60 menit sedangkan konsentrasi berada diantara 75-100%(v/v).

Kata kunci: biofilm, *Carica papaya L*, *Escherichia coli*, ekstrak air

1. PENDAHULUAN

Kehadiran biofilm dalam industri pangan berisiko tinggi mengancam tingkat keamanan pangan, karena biofilm dapat tumbuh dan berkembang pada produk susu, daging, buah dan sayuran segar (Chen *et al.* 2007). Selain itu biofilm dapat menimbulkan pembusukan makanan yang akan memperpendek masa simpan (*shelf-life*) maupun penyebaran penyakit melalui makanan (*foodborne disease*) (Houdt & Michiels 2010). Biofilm cenderung tumbuh dan berkembang dengan pesat terutama pada permukaan bahan yang lembab dan kaya akan nutrisi (Tarver 2009). Biofilm dapat hidup pada semua jenis permukaan di pabrik pengolahan makanan mulai dari lantai, dinding, pipa dan permukaan peralatan termasuk *stainless steel*, aluminium, nilon, teflon, karet, plastik, dan kaca (Chmielewski & Frank 2003). Peralatan yang kontak langsung dengan makanan dalam proses pengolahannya memungkinkan menjadi pusat terbentuknya biofilm.

Secara umum, bakteri memiliki kemampuan untuk menempel dan membentuk biofilm pada permukaan padat. Menempelnya bakteri pada permukaan benda padat merupakan langkah awal pembentukan biofilm (Donlan 2002). Biofilm yang terbentuk terperangkap di dalam matriks ekstraseluler yang dihasilkan oleh bakteri tersebut (Stoodly *et al.* 2002) Kandungan matriks ekstraseluler terdiri dari polisakari-

da, DNA ekstraseluler, protein, lemak dan air (Sutherland 2001). Biofilm sangat berpotensi merusak proses dan produk pangan, dikarenakan sebagian mikroorganisme dalam biofilm juga merupakan penyebab penyakit dan penghasil racun. Banyak spesies bakteri yang mampu membentuk biofilm dalam industri pangan, salah satu bakteri yang paling sering ditemukan adalah *Escherichia coli* (Lund *et al.* 2000).

Potensi yang besar sebagai sumber kontaminan mengakibatkan penelitian mengenai biofilm di bidang industri pangan semakin meluas. Biofilm berperan terhadap kerusakan pangan seperti pembusukan produk dan penyebaran penyakit. Beberapa penelitian terdahulu juga menunjukkan bahwa daya tahan terhadap kondisi-kondisi buruk dari mikroba yang membentuk biofilm pada proses pertumbuhannya lebih tinggi jika dibandingkan dengan sel planktonik (Donlan 2002). Banyak kerugian yang didapatkan akibat keberadaan biofilm dalam sistem pengolahan makanan, sehingga diperlukannya penghambatan pembentukan biofilm.

Pengendalian biofilm dapat dilakukan dengan memanfaatkan bahan alam yang salah satunya dapat menggunakan senyawa kimia dari tanaman berupa alkaloid, flavonoid, tanin, saponin, steroid dan triterpenoid. Ekstrak air daun pepaya berpotensi menghambat perlekatan, pertumbuhan dan pendegradasian biofilm. Menurut Arumugam *et al* (2014), ekstrak daun

pepaya mengandung flavonoid, alkaloid, saponin, steroid, triterpenoid dan tannin. Banyak kerugian yang didapatkan akibat keberadaan biofilm sehingga diperlukannya penelitian terhadap aktivitas ekstrak air daun pepaya sebagai antibiofilm dari bakteri *Escherichia coli*.

Tujuan dari penelitian ini adalah menguji aktivitas ekstrak air daun pepaya dalam pencegahan perlekatan, penghambatan pertumbuhan dan pendegradasian biofilm *Escherichia coli* serta menentukan kondisi optimum dari kinerja ekstrak air daun pepaya.

2. METODOLOGI

Bakteri uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah kultur *Escherichia coli* yang merupakan koleksi dari Laboratorium Mikrobiologi LIPI Cibinong dan daun pepaya yang diperoleh dari sekitar kampus IPB Dramaga. Bahan-bahan lain yang digunakan yaitu media *Eosin Methylene Blue* (EMB), media *Heterotrof* (HTR), etanol 96%, crystal violet 1%, akuades dan pereaksi uji fitokimia.

Alat-alat yang digunakan yaitu pipet mikro, neraca analitik, inkubator 37 dan 50°C, kertas saring, autoklaf, *laminar airflow*, vortex, *sentrifuge*, spektrofotometer, *microtiterplate flat-bottom polystyrene 96 wells*, dan *iMark Bio-Rad microplate reader*.

Preparasi Ekstrak Air Daun Pepaya (Modifikasi Gomashe *et al.* 2014)

Sampel daun pepaya (*Carica papaya* L.) yang digunakan dalam penelitian ini telah didefinisikan di LIPI-Pusat Konservasi Tumbuhan Kebun Raya Bogor. Sampel daun pepaya yang masih segar dicuci dengan air bersih, kemudian dibilas dengan etanol lalu dikeringkan pada temperatur ruang selama 1 minggu. Sampel yang

telah dikeringkan kemudian dihaluskan menggunakan blender. Sampel yang telah halus sebanyak 5 g diekstraksi dengan 100 mL akuades steril dengan cara maserasi selama 18 jam dan ditempatkan dalam shaker. Ekstrak disaring dengan kertas saring kemudian filtrat disentrifuse selama 5 menit dengan kecepatan 10.000 rpm kemudian disaring kembali sehingga didapatkan supernatan. Supernatan yang dihasilkan dianggap sebagai konsentrasi 100% (v/v) kemudian dibuat variasi konsentrasi 25%, 50%, 75% dan 100% (v/v) lalu disimpan dalam botol yang telah disterilkan.

Analisis Fitokimia (Harborne 1998)

Analisis fitokimia yang dilakukan terdiri atas uji alkaloid, saponin, flavonoid, triterpenoid, steroid dan tanin. Analisis fitokimia dilakukan untuk menentukan secara kualitatif komponen bioaktif yang terdapat pada ekstrak air daun pepaya.

Pembuatan Kultur Bakteri *Escherichia coli*

Bakteri uji dibiakkan pada media EMB (*Eosin Methylene Blue*) selama 24 jam pada suhu 37°C, untuk memperoleh kultur kerja. Sebanyak satu ose kultur kerja tersebut diperbanyak dengan cara dibiakkan ke dalam tabung berisi media HTR (*Heterotrof*) sebanyak 10 mL dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Kultur bakteri uji divorteks kemudian diukur nilai OD pada panjang gelombang 600 nm untuk mengetahui konsentrasi dari suspensi bakteri tersebut.

Uji Pencegahan Perlekatan Biofilm pada Permukaan (Modifikasi Sandasi *et al.* 2010)

Pengujian dilakukan dengan menggunakan *microtiterplate flat-bottom polystyrene*

96 wells. Pengujian dilakukan dengan variasi konsentrasi ekstrak daun pepaya 25; 50; 75 dan 100% (v/v). Sebanyak 200 µL ekstrak dimasukkan pada tiap well selama 60 menit, kemudian ekstrak yang telah melapisi permukaan mikroplate dikeluarkan dari well dan ditambahkan media HTR (*Heterotrof*) 100 µL dan suspensi bakteri *E.coli* sebanyak 100 µL ke dalam well untuk memulai pembentukan biofilm. Suspensi uji kemudian diinkubasi selama 72 jam pada suhu 37°C. Setelah masa inkubasi, mikroplate dicuci menggunakan air mengalir sebanyak tiga kali, kemudian ditambahkan 200 µL larutan *Crystal violet* 1 % ke tiap well dan diinkubasi pada suhu ruang selama 15 menit. Mikroplate dicuci kembali dengan cara yang sama seperti sebelumnya, yaitu dengan air mengalir sebanyak 3 kali. Larutan etanol 96% sebanyak 200 µL ditambahkan ke dalam tiap well dan dilakukan inkubasi kembali selama 15 menit pada suhu ruang. Pembacaan *Optical Density* (OD) dilakukan dengan *iMark Bio-Rad microplate reader* pada panjang gelombang 595 nm.

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

$OD_{kn} = OD \text{ kontrol negatif}$

$OD_{se} = OD \text{ sampel eksperimental}$

Uji Penghambatan Pertumbuhan dan Perkembangan Biofilm (Modifikasi Sandasi et al. 2010)

Pengujian dilakukan dengan *microtiter-plate flat-bottom polystyrene 96 wells*. Media yang digunakan adalah HTR 90 µL kemudian ditambahkan suspensi bakteri *E.coli* 50 µL dan ekstrak daun pepaya 60 µL dengan variasi konsentrasi 25; 50; 75 dan 100% (v/v) yang dimasukkan pada masing-masing well. Suspensi uji kemudian diinkubasi selama 72 jam pada suhu

37°C. Setelah masa inkubasi, mikroplate dicuci menggunakan air mengalir sebanyak tiga kali, kemudian ditambahkan 200 µL larutan *Crystal violet* 1 % ke tiap well dan diinkubasi pada suhu ruang selama 15 menit. Mikroplate dicuci kembali dengan cara yang sama seperti sebelumnya, yaitu dengan air mengalir sebanyak 3 kali. Larutan etanol 96% sebanyak 200 µL ditambahkan ke dalam tiap well dan dilakukan inkubasi kembali selama 15 menit pada suhu ruang. Pembacaan *Optical Density* (OD) dilakukan dengan *iMark Bio-Rad microplate reader* pada panjang gelombang 595 nm.

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

$OD_{kn} = OD \text{ kontrol negatif}$

$OD_{se} = OD \text{ sampel eksperimental}$

Uji Degradasi Biofilm (Modifikasi Prasasti dan Hertiani 2010)

Pengujian ini dilakukan seperti pada uji pencegahan perlekatan dan pertumbuhan biofilm, akan tetapi pada uji ini ekstrak uji ditambahkan pada saat biofilm telah terbentuk. Biofilm terbentuk setelah masing-masing well diinkubasi selama 72 jam pada suhu 37°C dengan 60 µL suspensi bakteri dalam 90 µL media HTR. Setelah terbentuknya biofilm, suspensi dalam mikroplate tersebut dibuang, kemudian ditambah 200 µL suspensi ekstrak daun pepaya dengan variasi konsentrasi 25; 50; 75 dan 100% v/v dan diinkubasi selama 60 menit. Setelah masa inkubasi, mikroplate dicuci menggunakan air mengalir sebanyak tiga kali dan langkah selanjutnya seperti pada uji pencegahan perlekatan dan penghambatan pertumbuhan biofilm dengan menggunakan larutan *Crystal violet* 1 %. Persentase pendegradasian dari biofilm dapat diukur dengan rumus sebagai berikut :

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

$OD_{kn} = OD \text{ kontrol negatif}$

$OD_{se} = OD \text{ sampel eksperimental}$

Uji Scanning Electron Microscopy (SEM)

Potongan polistirena berukuran 0.5 cm x 0.5 cm dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang berisi 2 mL suspensi bakteri dan 2 mL media HTR dan diinkubasi selama 72 jam pada suhu 37°C. Setelah biofilm terbentuk, potongan polistirena dicuci dengan air steril untuk mengeluarkan suspensi bakteri yang tidak membentuk biofilm. Potongan polistirena kemudian dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang berisi ekstrak daun pepaya selama 60 menit pada suhu 37°C. Potongan polistirena tanpa menggunakan ekstrak digunakan sebagai kontrol negatif. Setelah itu potongan polistirena tersebut dipreparasi dan diamati menggunakan instrumen *scanning electron microscope* tipe JEOL seri JSM-5310 LV di Puslit Widyasatwaloka, LIPI Cibinong.

Optimasi Aktivitas Antibiofilm Ekstrak Air Daun Pepaya

Optimasi hanya dilakukan pada aktivitas terbaik dari ekstrak daun pepaya. Rancangan optimasi menggunakan *Response Surface Methodology* (RSM). Faktor yang dioptimasi adalah konsentrasi ekstrak (X1) (25, 50, 75 dan 100% v/v), suhu (X2) (25, 37 dan 50°C), dan waktu kontak (X3) (30, 45 dan 60 menit). Data hasil penelitian yang diperoleh dianalisis menggunakan bantuan *software* Minitab 16.

ANALISIS STATISTIK

Data yang diperoleh dianalisis dengan menggunakan analisis ragam (*one-way ANOVA*)

dan dilanjutkan dengan uji Tukey HSD untuk menentukan perbedaan pengaruh konsentrasi pada tiap perlakuan dengan tingkat kepercayaan 95%. Penentuan aktivitas antibiofilm terbaik dari tiap perlakuan menggunakan analisis ragam (*two-way ANOVA*) dengan faktor yang digunakan adalah jenis perlakuan (pencegahan, penghambatan dan degradasi) dan konsentrasi ekstrak yang berbeda. Uji statistik dianalisis menggunakan bantuan *software* SPSS 16 dan Minitab 16.

3. HASIL

Senyawa Fitokimia

Hasil uji fitokimia yang tertera pada Tabel 1 menunjukkan ekstrak air daun pepaya mengandung senyawa metabolit sekunder berupa alkaloid, flavonoid, steroid dan tannin. Sementara itu, saponin dan triterpenoid menunjukkan hasil negatif.

Tabel 1 Hasil skrining fitokimia ekstrak air daun pepaya

Golongan Senyawa	Hasil Kualitatif
Flavonoid	+
Tannin	+
Alkaloid	+
Saponin	-
Steroid	+
Triterpenoid	-

Aktivitas Antibiofilm pada Konsentrasi Ekstrak Daun Pepaya yang Berbeda

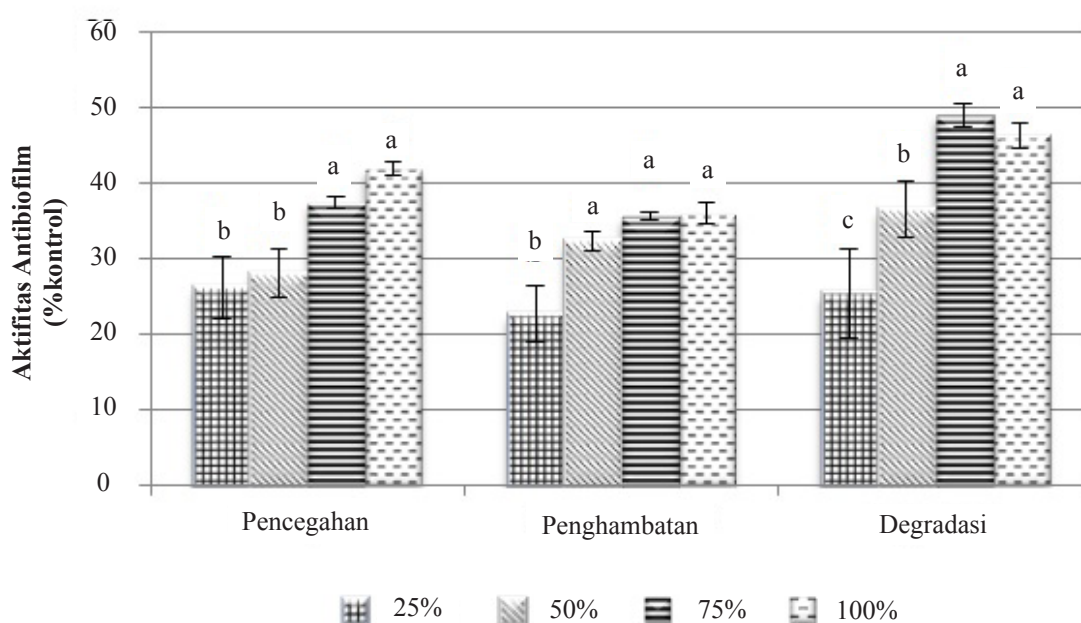
Berdasarkan hasil analisis statistik *one-way ANOVA*, pengaruh konsentrasi yang berbeda dari ekstrak daun pepaya dapat mencegah perlekatan, menghambat pertumbuhan dan mendegradasi biofilm secara signifikan ($P < 0.05$) dengan nilai aktivitas antibiofilm paling tinggi

masing-masing sebesar 41.89%, 36.02% dan 48.99% (Gambar 1), dimana semakin tinggi konsentrasi ekstrak semakin tinggi pula aktivitas antibiofilm yang dihasilkan.

Hasil uji statistik *two-way ANOVA* menunjukkan bahwa aktivitas degradasi biofilm dari ekstrak daun pepaya menghasilkan aktivitas terbaik dibandingkan pencegahan perlekatan dan penghambatan pertumbuhan biofilm.

Optimasi Aktivitas Degradasi Biofilm oleh Ekstrak Air Daun Pepaya

Hasil uji statistik aktivitas pendegradasian biofilm menggunakan RSM (*Response Surface Methodology*) pada Minitab 16 diperoleh hasil perlakuan konsentrasi dan waktu kontak tidak berpengaruh signifikan ($P > 0.05$), sedangkan perlakuan suhu menunjukkan hasil berpengaruh signifikan ($P < 0.05$). Ini menunjukkan bahwa pada masing-masing perlakuan suhu



Gambar 1 Aktivitas pencegahan perlekatan, penghambatan pertumbuhan dan degradasi biofilm dari ekstrak air daun pepaya pada berbagai konsentrasi

Tabel 2 Estimasi pengaruh variabel terhadap % pendegradasian biofilm dari ekstrak daun pepaya

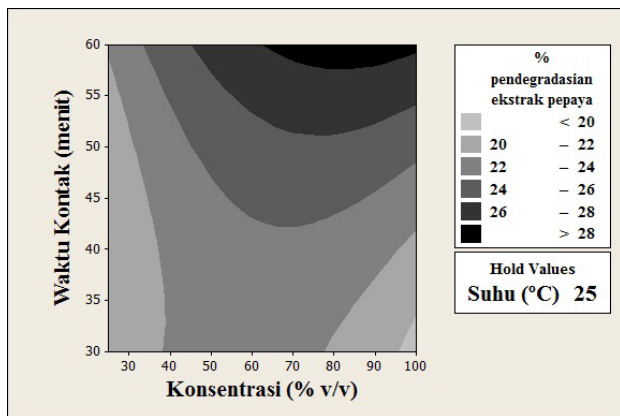
Variabel bebas	Koefisien	T	P
Konsentrasi	0.00049	0.177	0.860
Suhu	0.08542	6.863	0.000
Waktu kontak	-0.00697	-0.672	0.505
Konsentrasi* Konsentrasi	-0.00002	-1.111	0.272
Suhu* Suhu	-0.00121	-7.730	0.000
Waktu kontak* Waktu kontak	0.00004	0.387	0.700
R-Sq = 74.70% R-Sq (adj) = 70,15%			

Tabel 3 Analisis ragam model regresi terhadap respon % pendegradasian biofilm

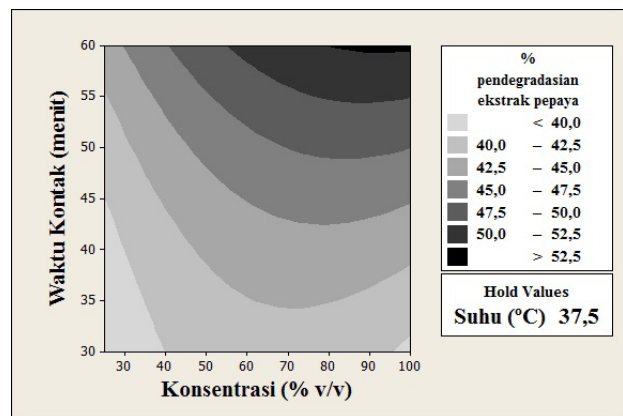
Sumber Keragaman	F	P
Regresi	16.41	0.000
Linear	17.65	0.000
Konsentrasi	0.03	0.860
Suhu	47.10	0.000
Waktu kontak	0.45	0.505
Square	40.81	0.000
Konsentrasi* Konsentrasi	1.24	0.272
Suhu* Suhu	59.75	0.000
Waktu kontak* Waktu kontak	0.15	0.700
<i>Lack of fit</i>	0.49	0.782

menunjukkan aktivitas pendegradasian biofilm yang berbeda-beda (Gambar 2a, b dan c), akan tetapi perlakuan konsentrasi dan waktu kontak yang berbeda-beda tidak menunjukkan aktivitas pendegradasian yang berbeda (Gambar 3a, b, dan c).

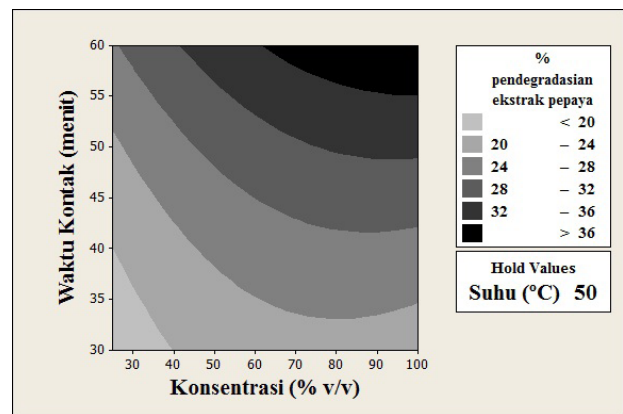
Setelah dilakukan optimasi menggunakan metode *Response Surface* didapat *Contour plot* seperti Gambar 3, dimana suhu optimum untuk pendegradasian biofilm dari ekstrak daun pepaya untuk menghasilkan aktivitas terbaik (> 52.5%) berada diantara 35-40°C, waktu kontak berada diantara 57-60 menit sedangkan konsentrasi berada diantara 75-100% (v/v) (Gambar 2b).



(a)

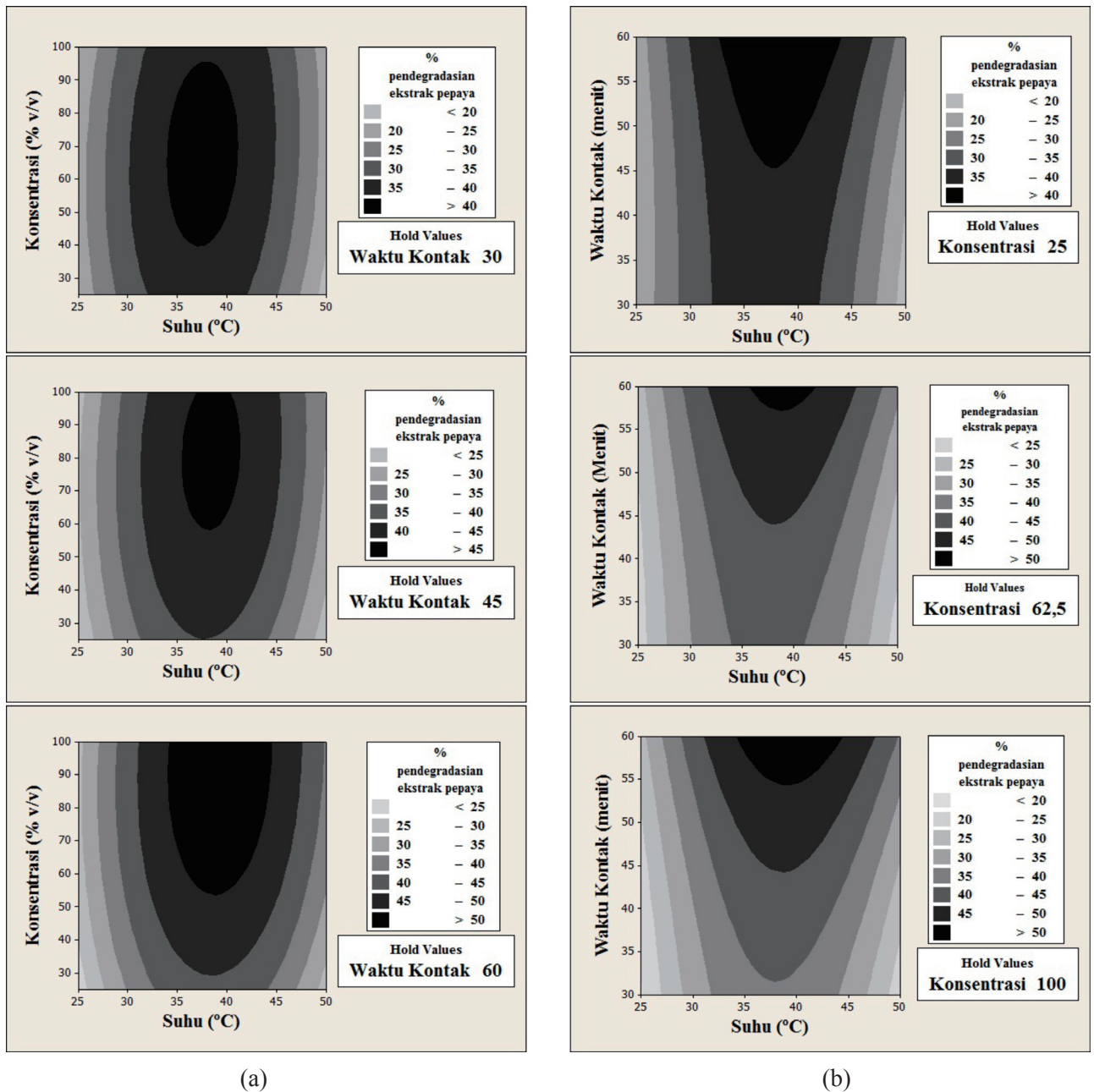


(b)



(c)

Gambar 2 *Contour plot* persen (%) pendegradasian biofilm terhadap faktor suhu yang berpengaruh secara signifikan ($P < 0.05$). (a) pada saat suhu 25°C (b) pada saat suhu 37°C (suhu optimal) dan (c) pada saat suhu 50°C

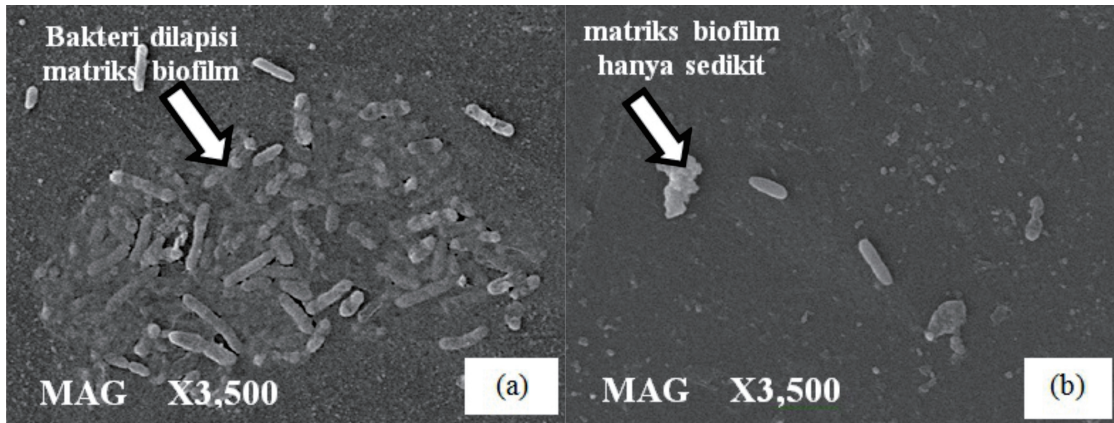


Gambar 3 *Contour plot* persen (%) degradasi biofilm terhadap faktor waktu kontak dan konsentrasi yang tidak berpengaruh secara signifikan ($P>0.05$). (a) pada waktu kontak 30, 45, 60 menit (b) pada konsentrasi 25, 62.5, 100 % (v/v)

Hasil *Scanning Electron Microscopy* (SEM)

Kontrol negatif menunjukkan pertumbuhan biofilm *E. coli* pada plat *polystyrene*. Melalui visualisasi SEM dapat dilihat agregasi bakteri yang dilapisi oleh matriks ekstraselular seperti pada Gambar 4 (a). Aktivitas ekstrak daun pepaya dalam pendegradasian biofilm ditunjuk-

kan pada Gambar 4 (b). Hasil SEM menunjukkan bahwa biofilm yang mendapat perlakuan ekstrak lebih bersih atau dalam hal ini matriks ekstraselular dari biofilm lebih sedikit bahkan tidak ada sama sekali bila dibandingkan dengan biofilm tanpa perlakuan.



Gambar 4 Kemampuan ekstrak daun pepaya dalam pendegradasian biofilm dengan SEM skala pembesaran 3,500 kali (a) tanpa perlakuan (b) pemberian ekstrak pepaya

4. PEMBAHASAN

Hasil uji fitokimia yang tertera pada Tabel 1 menunjukkan ekstrak air daun pepaya mengandung alkaloid, flavonoid, tannin dan steroid. Sementara itu, saponin dan triterpenoid menunjukkan hasil negatif. Adapun hasil penelitian Arumugam *et al* (2014) menunjukkan ekstrak daun pepaya mengandung flavonoid, alkaloid, saponin, steroid, triterpenoid dan tannin. Perbedaan hasil ini disebabkan oleh banyak faktor seperti faktor-faktor lingkungan dan ketersediaan air di dalam tanah (Nitisapto & Siradz 2005).

Aktivitas pendegradasian biofilm dari ekstrak daun pepaya menghasilkan aktivitas terbaik sebesar 48.99% dibandingkan pencegahan perlekatan (41.89%) dan penghambatan pertumbuhan biofilm (36.02%), hal tersebut diduga karena adanya senyawa metabolit sekunder dan beberapa enzim yang terdapat di dalam daun pepaya (Gambar 1). Getah pepaya mengandung tiga jenis enzim. Enzim papain merupakan enzim proteolitik yang dapat mendegradasi protein dan diduga dapat mendegradasi matriks ekstraselular yang terdapat pada biofilm. Enzim khimopapain yang berfungsi mengkatalisis reaksi

hidrolisis protein dan polipeptida, serta enzim lisozim yang berfungsi memecah dinding sel bakteri (Moussaoui *et al.* 2001).

Senyawa metabolit sekunder dalam ekstrak daun pepaya juga diduga membantu pendegradasian biofilm. Menurut penelitian Vikram *et al* (2010) flavonoid dapat menghambat ekspresi *gen lsrACDBF, csgA, csgB* yang merupakan regulator pembentukan *fimbria* pada biofilm *E.coli*, sehingga terganggunya metabolisme di dalam matriks ekstraselular dan mengakibatkan terhambatnya transport nutrisi (Lee *et al.* 2011). Pada penelitian Cobrado *et al* (2012) secara signifikan menunjukkan bahwa senyawa tanin dapat mereduksi aktivitas metabolisme biofilm. Tanin memiliki sifat dapat membentuk kompleks dengan ion logam yang dapat menyebabkan senyawa tanin bersifat toksik bagi membran mikroba (Akiyama *et al.* 2001). Pada ekstrak tanaman *Alnus japonica* yang telah diteliti oleh Lee *et al* (2013) yang memiliki kandungan tanin dan flavonoid diketahui mampu menghambat ekspresi *gen icaA* dan *icaD* yang merupakan salah satu regulator pembentukan biofilm. *Gen icaA* dan *icaD* dapat mensintesis *Polysaccharide Intercellular Adhesion* (PIA)

yang mempunyai peran penting dalam pembentukan biofilm (Rohde *et al.* 2010). Selain flavonoid dan tanin, alkaloid juga diduga berperan penting dalam penghambatan pembentukan biofilm, dengan menghambat aktivitas *quorum sensing* atau komunikasi antar sel (Park *et al.* 2008).

Optimasi pengoptimasian aktivitas antibiofilm terbaik yaitu aktivitas pendegradasian biofilm dilakukan menggunakan metode *Response Surface*. Optimasi aktivitas pendegradasian biofilm diperlukan untuk mengoptimalkan kinerja ekstrak. Metode *Response Surface* adalah teknik yang digunakan untuk memodelkan hubungan antara variabel respon dan faktor perlakuan. Metode ini dapat digunakan untuk menemukan bagian kombinasi yang menghasilkan respon maksimum atau optimal (Montgomery 2008). Faktor-faktor yang dioptimasi adalah konsentrasi ekstrak, suhu, dan waktu kontak, dimana faktor-faktor tersebut dianggap memiliki peranan penting dalam kinerja dari ekstrak yang diberikan.

Hasil pengujian menggunakan Metode *Response Surface* menunjukkan bahwa perlakuan konsentrasi dan waktu kontak tidak berpengaruh signifikan ($P > 0.05$), dimana dengan perlakuan konsentrasi (25, 50, 75 dan 100 % (v/v)) dan waktu kontak (30, 45, dan 60 menit) yang berbeda-beda tidak menunjukkan aktivitas pendegradasian biofilm yang berbeda (Gambar 3), sedangkan perlakuan terhadap suhu menunjukkan pengaruh secara signifikan ($P < 0.05$). Hasil penelitian menunjukkan suhu optimum ekstrak daun pepaya terhadap aktivitas antibiofilm berada pada suhu 37°C (>52.5%), sedangkan pada suhu ruang 25°C (>28%) dan pada suhu 50°C (>36%) menghasilkan aktivitas antibiofilm lebih rendah. Hal ini kemungkinan disebabkan oleh

aktivitas enzimatik yang terdapat pada ekstrak daun pepaya yang sangat dipengaruhi oleh suhu. Aktivitas enzim pada suhu ruang (25°C) masih dapat bekerja dengan baik walaupun tidak optimum atau reaksi berlangsung lambat. Kenaikan suhu juga akan meningkatkan aktivitas enzim sampai tercapainya aktivitas optimum. Kenaikan suhu lebih lanjut akan mengakibatkan menurunnya aktivitas enzim dan pada akhirnya merusak atau mendenaturasi enzim (Wuryanti 2004).

Hasil *Contour plot* pada Gambar 2b memperlihatkan puncak respon degradasi biofilm tertinggi ditandai oleh daerah dengan warna hitam gelap. Aktivitas degradasi (>52.5%) dihasilkan ketika suhu berada diantara 35-40°C, waktu kontak berada diantara 57-60 menit sedangkan konsentrasi berada diantara 75-100% (v/v).

Hasil SEM menunjukkan ekstrak pepaya mampu mendegradasi biofilm yaitu terlihat biofilm yang mendapat perlakuan ekstrak lebih bersih atau dalam hal ini matriks ekstraselular dari biofilm lebih sedikit bahkan tidak ada sama sekali bila dibandingkan dengan biofilm tanpa perlakuan. Komposisi utama dari biofilm adalah koloni bakteri dan matriks ekstraselular, dimana koloni bakteri diselimuti oleh matriks ekstraselular yang dihasilkan oleh bakteri tersebut (Karatan & Watnick 2009). Berdasarkan hasil mikrograf SEM menunjukkan ekstrak daun pepaya dapat mendegradasi matriks ekstraselular dan melisis sel target. Hasil ini memberikan landasan teoritis untuk aplikasi penggunaan ekstrak daun pepaya sebagai antibiofilm alami.

5. UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Kepala Pusat Penelitian Biologi LIPI Cibi-

nong yang telah memberikan izin untuk melakukan penelitian di Laboratorium Mikrobiologi, LIPI Cibinong. Penelitian ini didanai oleh Direktorat Jendral Pendidikan Tinggi (DIKTI) melalui Beasiswa Pendidikan Pascasarjana Dalam Negeri (BPPDN).

6. DAFTAR PUSTAKA

- Akiyama H, Fuji K, Yamasaki O, Oono T, Iwatsuki K. 2001. Antibacterial action of several tannins against *Staphylococcus aureus*. *J Antimicrob Chemother*. 48 : 487-491.
- Arumugam N, Boobalan T, Rajeswari PR, Duraimurugan MD. 2014. Antimicrobial activity and phytochemical screening of *Cynodon dactylon* and *Carica papaya*. *RIB*. 5(5): 21-31.
- Chen J, Rossman ML, Pawar DM. 2007. Attachment of enterohemorrhagic *Escherichia coli* to the surface of beef and a culture medium. *LWT – Food Science and Technology*. 40: 249–254.
- Chmielewski RAN & Frank JF. 2003. Biofilm formation and control in food processing facilities. *CRFSFS*. 2, 22-32.
- Cobrado L, Azevedo MM, Silva A. 2012. Cerium, chitosan and hamamelitannin as novel biofilm inhibitors. *J Antimicrob Chemother*. 67, 1159-1162.
- Donlan RM. 2002. Biofilms: Microbial life on surface. *Emerging Infectious Diseases*. 8 : 881-890.
- Gomashe AV, Sharma AA, Kasulkar A. 2014. Investigation of biofilm inhibition activity and antibacterial activity of *Psidium guajava* plant extracts against *Streptococcus mutans* causing dental plaque. *Int J Microbiol App Sci*. 3 (9) 335-35.
- Harborne JB. 1998. *Phytochemical Methods A Guide to Modern Techniques of Plant Analysis*. London. Chapman & Hall.
- Houdt RV & Michiels CW. 2010. Biofilm formation and the food industry, a focus on the bacterial outer surface (Review article). *J Appl Microbiol*. ISSN 1364-5072.
- Karatan E & Watnick P. 2009. Signals, regulatory networks, and materials that build and break bacterial biofilms. *Microbiol Mol Biol Rev*. 73, 310–347.
- Lee JH, Park JH, Cho HS, Joo SW, Cho MH, Lee J. 2013. Antibiofilm activities of quercetin and tannic acid against *Staphylococcus aureus*. *Biofouling*. 29; 5.
- Lee JH, Regmi SC, Kim JA, Cho MH, Yun H, Lee CS, Lee J. 2011. Apple flavonoid phloretin inhibits *Escherichia coli* O157:H7 biofilm formation and ameliorates colon inflammation in rats. *Infect Immun*. 79:4819-27.
- Lund BM, Baird-Parker TC, Gould GW. 2000. *The microbiological safety and quality of food*. Gaithersburg (US). Aspen Publishers Inc.
- Montgomery C. 2008. *Design and Analysis of Experiments: 7th edition*. Singapore (AU): Wiley and Sons Inc.
- Moussaoui E, Nijs M, Paul C, Wintjens R, Vincenzelli J, Azarkan M, Looze Y. 2001. Revisiting the enzymes stored in the laticifers of *Carica papaya* in the context of their possible participation in the plant defence mechanism. *CMLS*. 58: 556-570.
- Nitisapto M & Siradz SA. 2005. Evaluasi kesesuaian lahan untuk pengembangan jahe pada beberapa daerah di Jawa Tengah dan Jawa Timur. *JITL*. 5(2): 15-19.
- Park J, Kaufmann GF, Bowen JP, Arbiser JL, Janda KD. 2008. Solenopsin A, a venom alkaloid from the fire ant *Solenopsis invicta*, inhibits quorum-sensing signaling in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Infect Dis*. 198, 1198- 1201.
- Prasasti D dan Hertiani T. 2010. Potensi Campuran Minyak Atsiri Rimpang Temulawak dan Daun Cengkeh sebagai Inhibitor Plak Gigi. *J Indones Medical Plant*. 3 (2).
- Rohde H, Frankenberger S, Zahringer U, Mack D. 2010. Structure, function and contribution of polysaccharide intercellular adhesin (PIA) to *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation and pathogenesis of Biomaterial Associated Infections. *Eur J Cell Bio*. 89; 1.

- Sandasi M, Leonard CM, Viljoen AM. 2010. The *in vitro* antibiofilm activity of selected culinary herbs and medical plants against *Listeria Monocytogenes*. *LAM*. (50) 30-35.
- Stoodly P, Sauer K, Davies DG, Costerton JW. 2002. Biofilm as complex differentiated communities. *Annu Rev Microbiol*. 56: 187-209.
- Sutherland IW. 2001. The biofilm matrix—An immobilized but dynamic microbial environment. *Trends Microbiol*. 9, 222–227.
- Tarver T. 2009. Biofilms a threat to food safety. food technology. pp: 46-52 Available at: <http://www.ift.org> (05 Desember 2014)
- Vikram A, Jayaprakasha GK, Jesudhasan PR, Pillai SD, Patil BS. 2010. Suppression of bacterial cell–cell signalling, biofilm formation and type III secretion system by citrus flavonoids. *J Microbiol*. 109:515–27.
- Wuryanti 2004. Isolasi dan Penentuan Aktivitas Spesifik Enzim Bromelin dari Buah Nanas (*Ananas comosus* L.). *Artikel: JKSA*. Vol VII No. 3: 83-87.