

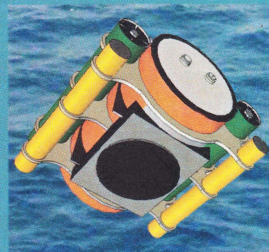


ISBN 978-602-8853-22-4

978-602-8853-23-1

**PROSIDING
SEMINAR HASIL-HASIL PENELITIAN
DAN PENGABDIAN KEPADA MASYARAKAT
INSTITUT PERTANIAN BOGOR
2014**

**Volume I
Bidang Pangan
Bidang Energi
Bidang Teknologi dan Rekayasa**



**INAKTIVASI MIKROBA OLEH KOMPONEN BAHAN ALAMI:
KERUSAKAN MEMBRAN SEL OLEH DAUN KESUM
DAN GETAH PEPAYA**

(Inactivation of Microorganisms by Natural Compounds: Cell Membran Leakage
by Kesum Leaves and Papaya Latex)

Harsi D. Kusumaningrum, Didah N. Faridah, F. Imelda, Rifah A. Hestiyani
Dep. Ilmu dan Teknologi Pangan, Fakultas Teknologi Pertanian, IPB

ABSTRAK

Pemanfaatan bahan alami pada proses pengolahan pangan secara tradisional dikaji pada penelitian ini sebagai upaya untuk mengungkap sisi ilmiah dan sekaligus melestarikan praktik yang telah diterapkan secara turun menurun. Tujuan penelitian ini adalah mempelajari mekanisme aktivitas antimikrob ekstrak bahan alami dalam menginaktivasi mikrob penyebab gangguan pencernaan. Bahan alami yang digunakan adalah daun kesum dan getah pepaya kering yang diekstrak dengan metode *ultrasonication assisted extraction* dengan pelarut etanol. Pengujian aktivitas antimikrob dilakukan dengan metode pengenceran makro, sedangkan pengujian kebocoran membran sel dengan metode spektrofotometri dan mikroskopi fluoresen dengan penanda DNA propidium iodida. Ekstrak daun kesum potensial sebagai sumber antimikrob alami dengan Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) 50 mg/ml untuk *E. coli* dan 30 mg/ml untuk *S. aureus*. Ekstrak getah pepaya kering juga memiliki aktivitas menghambat pertumbuhan *S. aureus* dengan nilai KHM 8 mg/ml. Senyawa aktif pada daun kesum maupun getah pepaya mampu mengakibatkan pelepasan material sel yang ditandai dengan meningkatnya nilai absorbansi 260 nm supernatan. Kerusakan membran juga ditunjukkan dengan meningkatnya jumlah sel yang berpendar merah akibat propidium iodida berikatan dengan DNA setelah diamati dengan mikroskop fluoresen.

Kata kunci: Daun kesum, getah pepaya, kerusakan membran sel.

ABSTRACT

Utilization of natural resources during traditional food process was studied to discover the scientific background and to maintain these practices that have been applied for some generations. Mechanisms of extracts of kesum leaves and papaya latex on inactivating pathogenic bacteria were studied. Extractions were conducted by ultra-sonication assisted extraction using ethanol. The antimicrobial activities of the ethanol extracts were tested by macro-dilution test. Cell membrane leakage was observed by measuring the optical density of the culture supernatant using spectrophotometry technique and red-fluorescent cells by fluorescence microscopy using DNA probe of propidium iodide. Ethanol extract of kesum leaves showed high activity on test bacteria with the Minimal Inhibitory Concentration (MIC) 50 mg/ml for *E.coli* and 30 mg/ml for *S. aureus*. Ethanol extract of dried papaya latex also showed inhibition on the growth of *S. aureus* with MIC of 8 mg/mL. Exposure to extract ethanol of kesum leaves and papaya latex resulted in cell membrane leakage of *S. aureus*, indicated by increasing of optical density at 260 nm of the supernatant culture of *S. aureus*. Moreover, the membrane leakages were also observed by increasing bacterial cells that red fluorescent using propidium iodide DNA probe.

Keywords: Cell membrane leakage, kesum leaves, papaya latex.

PENDAHULUAN

Indonesia kaya dengan keragaman hayati dan praktik pengolahan pangan dengan memanfaatkan sumber indigenus. Kesum (*Polygonum minus* Huds.) merupakan salah satu tanaman yang banyak ditemukan di Kalimantan Barat yang memiliki aroma wangi, citarasa yang khas dan rasa yang tajam (agak pedas). Selain meningkatkan citarasa masakan, daun kesum banyak dimanfaatkan sebagai tanaman herbal untuk pengobatan tradisional (Wasman *et al.* 2010; Qader *et al.* 2012). Berdasarkan kajian fitofarmaka, tanaman kesum memiliki aktivitas antiviral, antibakteri, antikapang, antioksidan, dan antikanker (Qader *et al.* 2012). Pemanfaatan bahan alami juga ditemukan di daerah Enrekang Sulawesi Selatan, yaitu penggunaan getah pepaya untuk menggumpalkan susu pada pembuatan dangke (tahu susu). Getah pepaya diperkirakan memiliki kemampuan sebagai senyawa antibakteri yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri tertentu. Papain yang dikandung getah pepaya diperkirakan memiliki peranan terhadap aktivitas antibakteri getah pepaya seperti yang dinyatakan oleh Seenivasan *et al.* (2010).

Penghambatan bakteri oleh senyawa antibakteri alami dapat terjadi melalui beberapa mekanisme, salah satunya adalah gangguan terhadap fungsi membran sitoplasma (Mrozik *et al.* 2004). Kerusakan membran akibat aktivitas antibakteri dapat mengakibatkan beberapa efek yang dapat diperiksa melalui beberapa cara (O' Neill *et al.* 2004). Salah satu metode yang dapat digunakan adalah dengan mengamati efek kebocoran membran yang mengakibatkan terlepasnya material sitoplasma, khususnya senyawa-senyawa dengan bobot 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, kerusakan membran sel juga dapat diamati dengan DNA probe staining menggunakan Propidium Iodida (PI). Penelitian ini bertujuan untuk mempelajari pengaruh ekstrak daun kesum dan getah pepaya terhadap membran sel *E. coli* dan *S. aureus* secara in-vitro dengan DNA probe staining dan deteksi pelepasan material sitoplasma.

METODE PENELITIAN

Bahan-bahan yang digunakan meliputi daun kesum (*Polygonum minus* Huds.) dari Pontianak Kalimantan Barat, getah pepaya yang diperoleh dari pepaya di kebun *University farm* IPB, papain (Merck, Jerman), kultur *S. aureus* ATCC 25923 dan *E. coli* ATCC 25922.

Ekstraksi Daun Kesum

Daun kesum segar (*Polygonum minus* Huds.) dibersihkan dan dikering-bekukan (*freeze dryer*, LABCONCO, British) selama 24 jam kemudian diblender (National, Taiwan) dan diayak dengan ayakan 48 mesh sehingga diperoleh bubuk berukuran 300 μm . Ekstraksi dilakukan dengan ultrasonikasi (Velickovic *et al.* 2007 dengan modifikasi) dengan pelarut etanol (J.T. Baker, US). Bubuk daun (25 g) diekstrak dengan 250 mL pelarut dalam erlenmeyer 500 mL dan diultrasonikasi dengan frekuensi 40 kHz pada suhu 40 ± 1 °C selama 20 menit (BRANSONIC Ultrasonic cleaner 8510E-MTH, USA). Campuran disaring dengan kertas saring Whatman no 1, selanjutnya supernatan diuapkan dengan rotari evaporator bertekanan rendah pada suhu 40 °C (BUCHI Rotavapor RII, Switzerland). Ekstrak dihembus dengan gas N_2 untuk menguapkan sisa pelarut dan disimpan dalam vial gelap pada suhu 4 °C sampai saat akan digunakan.

Ekstraksi Getah Pepaya

Buah pepaya muda (2–5 bulan) ditoreh dengan kedalaman kurang lebih 2–3 mm. Getah yang dikumpulkan selanjutnya dikeringkan dengan menggunakan oven vakum pada suhu 50–55 °C hingga getah kering dan tidak lengket kemudian dihaluskan menjadi bubuk kemudian ditentukan aktivitas proteolitiknya (Yapa *et al.* 1994). Getah tersebut kemudian diekstraksi untuk mendapatkan ekstrak etanol getah papaya dan papain kasar.

Getah pepaya kering dicampur etanol dengan perbandingan 1:20 kemudian dilakukan ultrasonikasi menggunakan sonikator selama 20 menit (Modifikasi Wang *et al.* 2008). Larutan getah yang telah melalui proses ultrasonikasi disaring menggunakan kertas Whatman no.1 filtrat yang diperoleh kemudian dipekatkan

dengan evaporasi menggunakan *rotary evaporator* dan dihembus dengan gas nitrogen hingga diperoleh berat konstan untuk mendapatkan ekstrak etanol kering.

Untuk mendapatkan papain kasar, getah pepaya kering dihomogenkan menggunakan buffer posfat pH 8. pH larutan, dibuat menjadi 5 dengan menggunakan HCl 6 M lalu diaduk selama 15 menit pada suhu 4 °C (Modifikasi Nitsawang *et al.* 2006). Filtrat dan bagian yang tidak larut dipisahkan dengan penyaringan menggunakan kertas saring Whatman no. 1. Filtrat yang diperoleh kemudian pH dibuat menjadi 9 dengan menggunakan NaOH 6 M dan diaduk selama 15 menit pada suhu 4 °C. Selanjutnya, filtrat yang diperoleh dipisahkan dan protease yang larut di dalamnya dipresipitasi menggunakan etanol dengan perbandingan 1:6. Endapan yang diperoleh dipisahkan dengan sentrifugasi pada kecepatan 4000 rpm pada suhu 4 °C. Presipitat dikeringkan menggunakan oven vakum pada suhu 50 °C hingga diperoleh papain kasar kering lalu digerus hingga diperoleh bubuk papain kasar. Papain kasar yang diperoleh dihitung rendemennya dan diukur aktivitas proteolitiknya menggunakan metode Bergmeyer.

Persiapan Bakteri Uji

Kultur stok yang digunakan adalah *S. aureus* ATCC 25923 dan *E. coli* ATCC 25922. Kultur yang dipelihara pada TSA (Oxoid, England) miring pada suhu 4 °C diinokulasi ke BHIB (Oxoid, England) dan diinkubasi pada suhu 37 °C selama 18–24 jam. Suspensi bakteri selanjutnya digores pada TSA cawan dan diinkubasi pada suhu 37 °C selama 48 jam. Koloni tunggal ditransfer ke TSB (Oxoid, England) dan diinkubasi pada suhu 37 °C selama 18–24 jam (Oonmettaree *et al.* 2006).

Penentuan Konsentrasi Hambat Minimum (KHM)

KHM ditentukan menggunakan metode klasik (*macrodilution*) dengan pengenceran berturut-turut sebagaimana yang dilakukan Mazzola *et al.* (2009) dengan modifikasi. Dalam 6 tabung ditambahkan 1 mL TSB kecuali untuk tabung pertama, ditambahkan 2,5 mL TSB. Untuk tabung pertama ditambahkan 2,5 mL ekstrak etanol kesum atau getah pepaya (200 mg/ml), tabung divorteks dan 1 mL dipindahkan ke tabung ke 2. Perlakuan ini diulang dan dilakukan secara

berturut-turut sampai tabung ke 5 sehingga diperoleh konsentrasi 100; 50; 25; 12,5; dan 6,25 mg/ml. Selanjutnya setiap tabung diinokulasi dengan 0,1 mL bakteri uji (10^6 CFU), kecuali untuk tabung pertama (0,4 mL bakteri uji). Tabung ke 6 sebagai kontrol (TSB + bakteri uji). Tabung diinkubasi pada suhu 35 ± 2 °C selama 24 jam. Selanjutnya 100 µl suspensi (dari setiap tabung uji) disebar di TSA cawan dan diinkubasi pada 35 ± 2 °C selama 18–24 jam. KHM adalah tabung dengan konsentrasi yang tidak menunjukkan pertumbuhan bakteri (bening) atau konsentrasi terendah antibakteri yang mampu mereduksi viabilitas inokulum sebesar 90% dari inokulum awal (Cosentino *et al.* 1999).

Pelepasan Material Sitoplasma (Oonmetta-areea *et al.* 2006 dengan Modifikasi)

Bakteri uji diinokulasi pada 10 mL media TSB lalu diinkubasi selama 18–24 jam pada 35 °C. Sentrifugasi dengan kecepatan 10.000 rpm selama 10 menit dilakukan setelah inkubasi, sel disuspensikan kembali di dalam NaCl (0,85–0,9%) suspensi dibuat mencapai konsentrasi 10^{10} cfu/ml. Antimikroba ditambahkan ke media dengan konsentrasi terpilih dengan waktu paparan selama 2 jam pada suhu 37 °C. Kemampuan antimikrob dalam merusak membran sel ditentukan dengan menghitung nilai OD supernatan pada panjang gelombang 260 dan 280 nm menggunakan spektrofotometer UV-VIS 1800.

Selanjutnya juga dilakukan penentuan kandungan protein supernatan (Henie *et al.* 2009; Klotz *et al.* 2010). Sel bakteri yang sudah terpapar senyawa antimikrob, dipisahkan dengan sentrifugasi pada 10.000 rpm selama 5 menit. Kandungan protein supernatan ditentukan dengan pereaksi Bradford, 1 mL pereaksi Bradford ditambahkan ke 1 mL supernatan dan diinkubasi pada suhu ruang selama 5 menit. Absorbansi diukur menggunakan spektrofotometer pada 595 nm dan *Bovine serum albumin* (BSA) sebagai protein standar pada konsentrasi 0–20 µg/ml.

Deteksi Kerusakan Membran Sel dengan DNA Probe Staining

Suspensi bakteri uji yang telah dipaparkan ekstrak daun kesum atau getah pepaya disentrifus untuk memperoleh pelet bakteri uji. Selanjutnya pelet dibilas sebanyak tiga kali dengan larutan garam fisiologis. Penandaan dilakukan dengan

menggunakan 200 μ L SYBR Green dan 200 μ L propidium iodida lalu diinkubasi selama 15 menit pada suhu ruang dan kondisi gelap, kemudian diamati menggunakan mikroskop fluoresens. Sel dengan membran yang rusak menghasilkan fluoresensi merah. Fluoresensi merah terbentuk pada eksitasi maksimum 535 nm dan emisi maksimum 617 nm.

Pengolahan Data

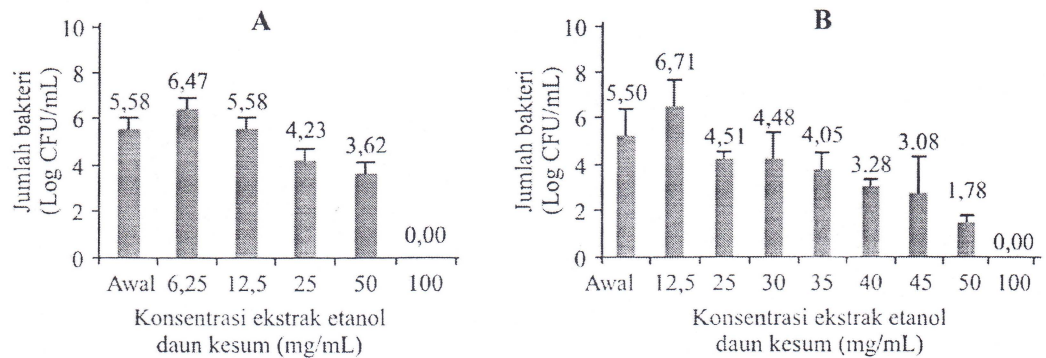
Data hasil pengujian dari 3 ulangan diolah secara statistik dan analisis sidik ragam (untuk skrining aktivitas antibakteri) dengan taraf signifikansi 0,05. Jika terdapat pengaruh yang nyata ($p < 0,05$), maka dilanjutkan dengan uji Duncan. *Software* yang digunakan adalah IBM SPSS *Statistics* 20. Hasil dilaporkan sebagai nilai rata-rata \pm standar deviasi (SD).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Konsentrasi Hambat Minimum Ekstrak Daun Kesum dan Getah Pepaya

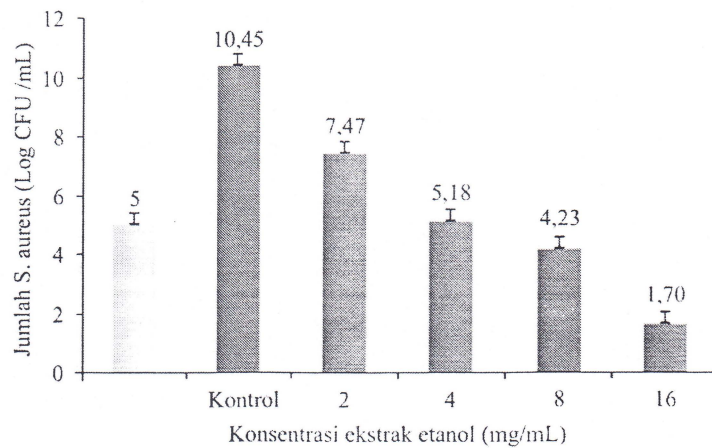
Nilai KHM ekstrak etanol daun kesum terhadap *E. coli* adalah 25 mg/ml dimana pada konsentrasi ini dapat menghambat 90% pertumbuhan dari jumlah awal inokulum, yaitu dari 5,58 log CFU/ml menjadi 4,23 log CFU/ml. Nilai KHM ekstrak etanol daun kesum terhadap *E. coli* adalah 25 mg/ml *S. aureus* adalah 30 mg/ml dimana pada konsentrasi ini dapat dari jumlah awal inokulum, yaitu 5,50 log CFU/ml menjadi 4,48 log CFU/ml, (Gambar 1). Nilai KHM menyatakan konsentrasi terendah antibakteri yang mampu mereduksi viabilitas inokulum sebesar 90% dari inokulum awal (Cosentino *et al.* 1999) atau konsentrasi terendah antibakteri yang tidak menunjukkan pertumbuhan (tidak keruh) pada media cair. Nilai KHM ekstrak etanol daun kesum lebih besar dibandingkan dengan ekstrak kasar dari akar tanaman dengan genus yang sama, yaitu *Polygonum cuspidatum*. KHM ekstrak kasar dari akar *P. cuspidatum* terhadap *E. coli* sebesar $>2,5$ mg/ml dan *S. aureus* sebesar 312,5 μ g/ml, diperoleh dengan metode pengenceran mikro (*microdilution*) (Shan *et al.* 2008). Tanaman ini merupakan tanaman obat tradisional di China, Korea, dan Jepang yang dimanfaatkan sebagai analgesik, antipiretik, diuretik, ekspektoran, dan antitusif. Nilai KHM yang tinggi dari ekstrak kasar mungkin tidak praktis untuk diaplikasikan ke bahan pangan sebagai

pengawet. Namun, hasil ini mengindikasikan adanya kandungan senyawa aktif yang potensial untuk dipelajari lebih lanjut. Senyawa aktif tersebut dapat dipisahkan dari ekstrak kasar untuk selanjutnya diisolasi, dimurnikan, dan diidentifikasi.



Gambar 1 Kemampuan penghambatan ekstrak etanol daun kesum terhadap (A) *E. coli* dan (B) *S. aureus*.

Hasil lain yang diperoleh menunjukkan nilai KHM ekstrak etanol getah pepaya terhadap *S. aureus* adalah sebesar 8 mg/mL (Gambar 2).

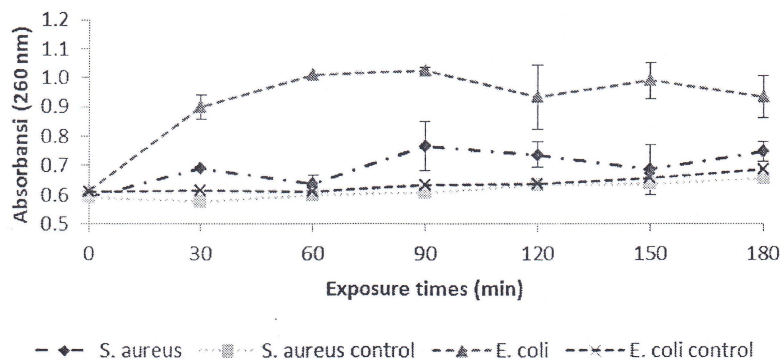


Gambar 2 Penghambatan ekstrak etanol getah pepaya terhadap *S. aureus*. Gambar batang pertama menunjukkan jumlah awal *S. aureus*.

Ashok *et al.* (2011) juga menunjukkan kemampuan ekstrak petroleum eter dan metanol getah pepaya menghambat pertumbuhan *E. coli*, *P. aeruginosa*, dan *S. aureus*. Sifat antibakteri ekstrak 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).

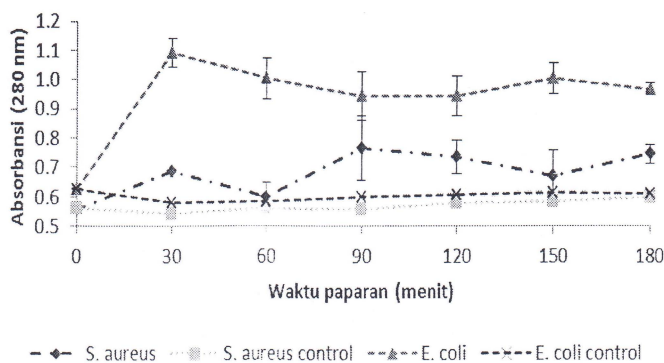
Kerusakan Membran Sel Akibat Paparan Ekstrak Etanol Daun Kesum

Ketika suspensi *E. coli* dan *S. aureus* dipaparkan dengan ekstrak etanol daun kesum, terlihat adanya peningkatan absorbansi supernatan pada 260 nm dimulai pada menit ke 30 dibandingkan kontrol. Asam nukleat, baik DNA maupun RNA diketahui menyerap maksimal sinar UV pada 260 nm. Ini merupakan indikasi terjadinya kerusakan berat dan irreversibel pada membran sitoplasma bakteri uji (Carson *et al.* 2002). Membran sitoplasma adalah komponen struktural yang mungkin menjadi rusak dan secara fungsional tidak valid ketika suspensi bakteri terpapar senyawa antimikroba. Jika membran sel terganggu, ion kecil seperti K^+ dan PO_4^{3-} cenderung untuk keluar pertama diikuti oleh molekul besar seperti DNA, RNA, dan material lain (Shan *et al.* 2008; Xing *et al.* 2009). Nilai absorbansi supernatan *E. coli* lebih besar dibandingkan supernatan *S. aureus* untuk waktu yang sama (Gambar 3).



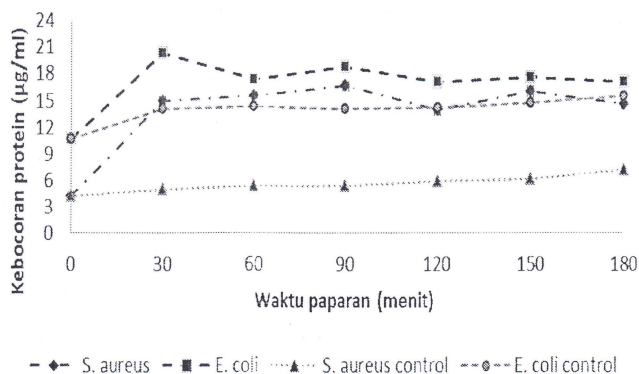
Gambar 3 Pelepasan material sel yang diserap pada 260 nm dari suspensi *E. coli* dan *S. aureus* setelah diberi perlakuan ekstrak etanol daun kesum (pada konsentrasi 4xKHM) dibandingkan dengan kontrol *E. coli* dan kontrol *S. aureus*.

Peningkatan absorbansi supernatan *E. coli* dan *S. aureus* juga terlihat pada 280 nm (Gambar 4). Seperti pada 260 nm, peningkatan absorbansi dimulai pada menit ke 30. Protein dengan cincin aromatik seperti tirosin dan triptofan diketahui menyerap sinar UV pada 280 nm. Hasil ini memiliki pola yang mirip dengan absorbansi supernatan pada 260 nm, dimana absorbansi supernatan *E. coli* lebih besar dibandingkan supernatan *S. aureus* untuk waktu yang sama. Hasil ini menunjukkan penambahan ekstrak etanol daun kesum mengganggu permeabilitas membran sel yang menginduksi kebocoran material sitoplasma.



Gambar 4 Pelepasan material sel yang diserap pada 280 nm dari suspensi *E. coli* dan *S. aureus* dengan perlakuan ekstrak etanol daun kesum (pada konsentrasi 4xKHM) dibandingkan dengan kontrol *E. coli* dan kontrol *S. aureus*.

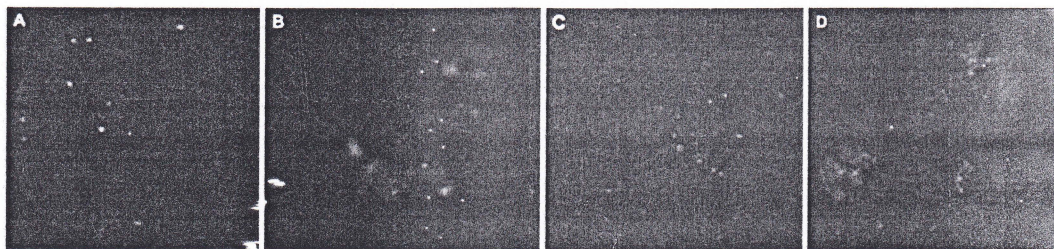
Kebocoran protein dari bakteri uji juga di analisa menggunakan uji Bradford. Kebocoran protein *S. aureus* mengalami peningkatan setelah diberi perlakuan ekstrak etanol daun kesum mulai menit ke 30 dan mencapai maksimal pada menit ke 90. Sebaliknya pada kontrol *S. aureus* tidak terlihat peningkatan kebocoran protein yang berarti (Gambar 5), sejalan dengan hasil yang diperoleh pada 280 nm.



Gambar 5 Kebocoran protein dari *E. coli* dan *S. aureus* dengan perlakuan ekstrak etanol daun kesum (pada konsentrasi 4xKHM) dibandingkan dengan kontrol *E. coli* dan kontrol *S. aureus*.

Pola yang berbeda terlihat pada *E. coli* dimana setelah menunjukkan peningkatan kebocoran protein sampai dengan menit ke 90, terjadi penurunan yang mendekati kontrol pada menit ke 180. Diduga berhubungan dengan kemampuan sel beradaptasi. Klotz *et al.* (2010) melaporkan terganggunya integritas membran *E. coli* menyebabkan bocornya protein sebelum sel kehilangan viabilitasnya. Protein yang dilepas keluar sel memiliki berat molekul rendah antara 8–11 kDa.

Permeabilitas membran sel bakteri uji juga diamati menggunakan mikroskop fluoresen setelah diwarnai dengan *propidium iodida* (PI). PI dikenal juga sebagai DNA *probe staining* tidak dapat berdifusi atau menembus ke dalam sel bakteri karena memiliki ukuran molekul yang besar (Otto *et al.* 2010). PI hanya bisa berpenetrasi ke dalam sel bakteri bila terdapat pori atau kebocoran pada membran sel (Torrent *et al.* 2010), selanjutnya akan berikatan DNA sel bakteri dan fluoresensi merah akan terlihat dibawah mikroskop fluorescen (Otto *et al.* 2010). Sel bakteri uji, baik *E. coli* maupun *S. aureus* menunjukkan peningkatan intensitas fluoresensi merah setelah dipaparkan dengan ekstrak etanol daun kesum selama 30 menit (Gambar 6).



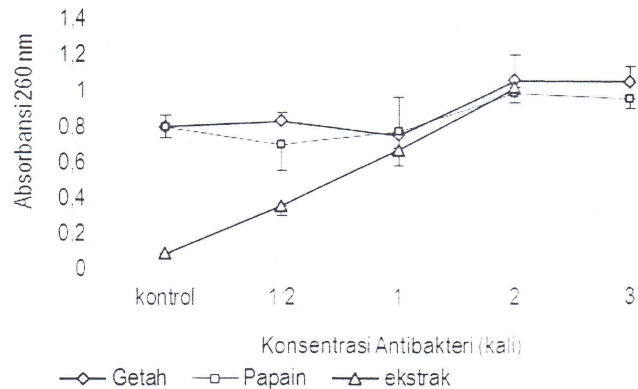
Gambar 6 Sel bakteri uji yang diwarnai dengan PI (A) kontrol *E. coli*, (B) *E. coli* setelah dipaparkan dengan ekstrak etanol daun kesum selama 30 menit (pada konsentrasi 4xKHM), (C) kontrol *S. aureus*, dan (D) *S. aureus* setelah dipaparkan dengan ekstrak etanol daun kesum selama 30 menit (pada konsentrasi 4xKHM).

Terganggunya permeabilitas membran sel setelah dipaparkan dengan ekstrak etanol daun kesum terkait adanya sejumlah komponen aktif pada ekstrak, sehingga mekanisme aksi ekstrak dapat memengaruhi berbagai lokasi target pada bakteri uji. Daun kesum dilaporkan mengandung senyawa fenolik sebagai senyawa utama dengan total fenolik yang tinggi (Huda-Faujan *et al.* 2007; Maizura *et al.* 2011; Qader *et al.* 2012). Senyawa fenolik dilaporkan dapat mengganggu membran sitoplasma, mengganggu kekuatan motif proton, aliran elektron dan transportasi aktif (Burt 2004).

Pengaruh Ekstrak Getah Pepaya Terhadap Membran Sel *S. aureus*

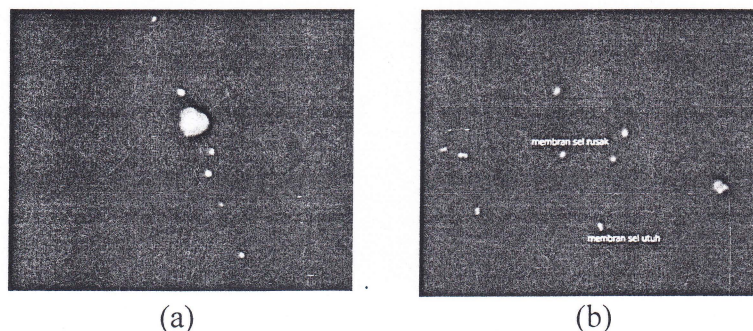
Kebocoran membran sel akibat aktivitas antibakteri mengakibatkan dilepaskannya molekul-molekul berukuran kecil dari dalam sitoplasma. Hasil pengukuran absorbansi untuk masing-masing perlakuan yang diperlihatkan pada Gambar 7 menunjukkan perubahan nilai absorbansi seiring perubahan konsentrasi

antibakteri yang digunakan, semakin tinggi konsentrasi nilai absorbansi yang diperoleh semakin tinggi. 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 (Carson *et al.* 2002). Hasil ini mengindikasikan getah pepaya kering, papain, dan ekstrak etanol mampu mengakibatkan kebocoran membran sel.



Gambar 7 Absorbansi 260 nm supernatan. Konsentrasi antibakteri yang dimaksud adalah 0,0027 g getah pepaya kering atau 0,0011 g papain dalam 100 mL dan nilai KHM ekstrak etanol getah pepaya.

Metode lain untuk mendeteksi kerusakan membran yang digunakan pada penelitian ini adalah dengan pengamatan efek antibakteri terhadap membran sel menggunakan mikroskop fluoresen. Gambar 8a menunjukkan sel utuh yang diwarnai dengan SYBR Green 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. Sel dengan membran yang rusak diperlihatkan pada Gambar 8b, warna merah dihasilkan dari ikatan antara pewarna PI dengan DNA.



Gambar 8 Penampakan *S. aureus* dengan membran utuh menunjukkan fluoresensi hijau (a) dan fluoresensi merah yang dihasilkan oleh sel yang mengalami kebocoran membran (b) di bawah mikroskop fluoresens dengan perbesaran 10×100 .

PI tidak mampu berdifusi ke dalam sel yang memiliki 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). 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. Sebagaimana disebutkan di atas, 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).

Membran sel bakteri Gram positif dilapisi oleh dinding sel yang tersusun atas peptidoglikan yang mengandung GlcNAc, N-acetyl murmeric acid dan asam amino D- dan L- yang mampu berikatan dengan ion positif dari senyawa antibakteri. Ikatan yang terbentuk ini menyebabkan gangguan pada membran sel hingga terjadi kebocoran akibat perubahan tekanan osmotik (Seenivasan *et al.* 2010). Hal ini dibuktikan dengan terbentuknya fluoresensi merah setelah pewarnaan dengan PI (Gambar 8b).

KESIMPULAN

Ekstrak etanol daun kesum potensial sebagai sumber antimikrob alami dengan konsentrasi hambat minimum 25 mg/ml untuk *E. coli* dan 30 mg/ml untuk *S. aureus*. Papain dan komponen non-proteolitik getah pepaya yang diekstraksi dengan etanol juga menunjukkan kemampuan menghambat pertumbuhan *S. aureus* hingga 90%. Deteksi pelepasan material sitoplasma mengindikasikan gangguan integritas membran sitoplasma sel *E. coli* dan *S. aureus* akibat terpapar ekstrak etanol daun kesum. Getah pepaya kering, papain, dan ekstrak etanol getah pepaya juga dapat 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 (Desentralisasi IPB) tahun 2013/2014, Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi Kementerian Pendidikan dan Kebudayaan.

DAFTAR PUSTAKA

- 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. *App Environ Microbiol.* 73(10): 3283–3290. doi:10.1128/AEM.02750-06.
- Burt S. 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods-a review. *Int J Food Microbiol.* 94(3): 223–253. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2004.03.022.
- 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 Chemother.* 46(6): 1914–1920. DOI: 10.1128/AAC.46.6.1914–1920.2002.
- 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 Microbiol.* 29(2): 130–135.
- Giao MS, Wilks SA, Azevedo NF, Vieira MJ. 2009. Validation of SYTO 9/propidium iodide uptake for rapid detection of viable but non cultivable *Legionella pneumophila*. *Microb Ecol.* 58(1): 56–62. DOI: 10.1007/s00248-008-9472-x.
- Henie EFP, Zaiton H, Suhaila M. 2009. Bacterial membrane disruption in food pathogens by *Psidium guajava* leaf extracts. *Int Food Res J.* 16(3): 297–311.
- Huda-Faujan N, Noriham A, Norrakiah AS, Babji AS. 2007. Antioxidative activities of water extracts of some Malaysian herbs. *ASEAN Food J.* 14(1): 61–68.
- Klotz B, Manas P, Mackey BM. 2010. The relationship between membrane damage, release of protein and loss of viability in *Escherichia coli* exposed to high hydrostatic pressure. *Int J Food Microbiol.* 137 (2): 214–220.

- Krishna KL, Paridhavi M, Patel JA. 2008. Review on nutritional, medicinal and pharmacological properties of Papaya (*Carica papaya* Linn.). *Nat Prod Rad.* 7(4): 364–373.
- Liu H, Du Y, Wang X, Sun L. 2004. Chitosan kills bacteria through cell membrane damage. *Int J Food Microbiol.* 95(3): 147–155.
- Maizura M, Aminah A, Wan Aida WM. 2011. Total phenolic and antioxidant activity of Kesum (*Polygonum minus*), Ginger (*Zingiber officinale*) and Turmeric (*Curcuma longa*) extract. *Int Food Res J.* 18(2): 529–534.
- Mazzola PG, Jozala AF, Novaes LCL, Moriel P, Penna CV. 2009. Minimal inhibitory concentration (MIC) determination of disinfectant and/or sterilizing agents. *Braz J Pharm Sci.* 45(2): 241–248.
- O'Neill AJ, Miller K, Oliva B, Chopra I. 2004. Comparison of assays for detection of agents causing membrane damage in *Staphylococcus aureus*. *J Antimicrob Chemother.* 54(6): 1127–1129. doi: 10.1093/jac/dkh476.
- Oonmetta-aree J, Suzuki T, Gasaluck P, Eumkeb G. 2006. Antimicrobial properties and action of galangal (*Alpina galangal* Linn.) on *Staphylococcus aureus*. *Lebensm Wiss Technol.* 39(10): 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 Clin Microbiol Antimicrob.* 9: 1-13.
- Qader SW, Abdulla MA, Chua LS, Hamdan S. 2012. Potential bioactive property of *Polygonum minus* Huds (kesum) – review. *Sci Res Essays.* 7(2): 90–93. doi:10.5897/SRE11.1789
- Santo CE, Lam EW, Elowsky CG, Quaranta D, Domaille DW, Chang CJ, Grass G. 2011. Bacterial killing by dry metallic copper surfaces. *App Environ Microbiol.* 77(3): 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.
- Shan B, Cai Y, Brooks JD, Corke H. 2008. Antibacterial properties of *Polygonum cuspidatum* roots and their major bioactive constituents. *Food Chem.* 109(3): 530–537. doi:10.1016/j.foodchem.2007.12.064.
- Torrent M, Shancez-Chardi A, Nogues MV, Boix E. 2010. Assessment of Antimicrobial Compounds by Microscopy Techniques. *Microscopy: Science, Technology, Applications and Education.* 1115–1126.

- Velickovic DT, Nikolova MT, Ivancheva SV, Stojanovic JB, Veljkovic VB. 2007. Extraction of flavonoids from garden (*Salvia officinalis* L.) and glutinous (*Salvia glutinosa* L.) sage by ultrasonic and classical maceration. *J Serb Chem Soc.* 72(1): 73–80. doi:10.2298/JSC0701073V.
- 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(2): 804–810. DOI: 10.1016/j.foodchem.2007.06.062.
- Wasman SQ, Mahmood AA, Salehuddin H, Zahra AA, Salmah I. 2010. Cytoprotective activities of *Polygonum minus* aqueous leaf extract on ethanol-induced gastric ulcer in rats. *J Med Plant Res.* 4(24): 2658–2665.
- Xing K, Chen XG, Kong M, Liu CS, Cha DS, Park HJ. 2009. Effect of oleoyl-chitosan nanoparticles as a novel antibacterial dispersion system on viability, membrane permeability and cell morphology of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Carb Pol.* 76(1): 17–22. doi:10.1016/j.carbpol.2008.09.016
- Yapa PAJ, Deshapriya R. 1994. Some aspects of enhancement of proteolytic activity of papain. *Vidyodaya J Sci.* 5: 99–106.