

**UJI AKTIVITAS EKSTRAK ETANOL BIJI ALPUKAT (*Persea Americana*
Mill.) TERHADAP KADAR IL-10 DAN JUMLAH BAKTERI DALAM
DARAH MENCIT (*Mus musculus*) YANG DIINFEKSI *Staphylococcus*
*aureus***

SKRIPSI

Oleh:

AULIA NUR KUMALA DEWI

NIM. 13620054



**JURUSAN BIOLOGI
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI
MAULANA MALIK IBRAHIM MALANG
2019**

**UJI AKTIVITAS EKSTRAK ETANOL BIJI ALPUKAT (*Persea americana*
Mill.) TERHADAP KADAR IL-10 DAN JUMLAH BAKTERI DALAM
DARAH MENCIT (*Mus musculus*) YANG DIINFEKSI *Staphylococcus*
*aureus***

SKRIPSI

**Diajukan kepada:
Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang
Untuk Memenuhi Salah Satu Persyaratan dalam
Memperoleh Gelar Sarjana Sains (S.Si)**

**Oleh:
AULIA NUR KUMALA DEWI
NIM. 13620054**

**JURUSAN BIOLOGI
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI
MAULANA MALIK IBRAHIM MALANG
2019**

UJI AKTIVITAS EKSTRAK ETANOL BIJI ALPUKAT (*Persea americana* Mill.) TERHADAP KADAR IL-10 DAN JUMLAH BAKTERI DALAM DARAH MENCIT (*Mus musculus*) YANG DIINFEKSI *Staphylococcus aureus*

SKRIPSI

Oleh:
AULIA NUR KUMALA DEWI
NIM. 13620054

Telah disetujui oleh:

Dosen Pembimbing Biologi

Dosen Pembimbing Agama

Dr. Hj. Retno Susilowati, M.Si
NIP. 19671113 1994 02 2001

Mujahidin Ahmad, M.Sc
NIP.198605122019031002

Tanggal 2 Desember 2019

Mengetahui,

Ketua Jurusan Biologi



Romaidi, M. Si., D. Sc

NIP. 19810201 200901 1 019

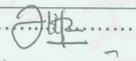
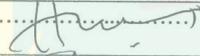
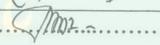
**UJI AKTIVITAS EKSTRAK ETANOL BIJI ALPUKAT (*Persea americana*
Mill.) TERHADAP KADAR IL-10 DAN JUMLAH BAKTERI DALAM
DARAH MENCIT (*Mus musculus*) YANG DIINFEKSI *Staphylococcus*
*aureus***

SKRIPSI

Oleh:
AULIA NUR KUMALA DEWI
NIM. 13620054

Telah Dipertahankan Di Depan Dewan Penguji Skripsi
Dan Dinyatakan Diterima sebagai Salah Satu Persyaratan Untuk Memperoleh
Gelara Sarjana Sains (S.Si)

Tanggal 27 Desember 2019

Penguji Utama	Dr. Hj. Ulfah Utami, M.Si NIP. 19650509 199903 2 002	(..... )
Ketua Penguji	drg. Anik Listiyana, M.Biomed NIP. 19800805 200912 2 001	(..... )
Sekretaris	Dr. Hj. Retno Susilowati, M.Si NIP. 19671113 199402 2 001	(..... )
Anggota	Mujahidin Ahmad, M.Sc NIP. 198605122019031002	(..... )

Mengetahui,
a.n Ketua Jurusan Biologi



Romaidi, M.Si., D. Sc
NIP. 19810201 200901 1 019

**SURAT PERNYATAAN
ORISINALITAS PENELITIAN**

Saya yang bertanda tangan dibawah ini:

Nama : Aulia Nur Kumala Dewi

NIM : 13620054

Jurusan : Biologi

Fakultas : Sains dan Teknologi

Judul Skripsi : Uji Aktivitas Ekstrak Etanol Biji Alpukat (*Persea americana* Mill.) Terhadap Kadar IL-10 dan Jumlah Bakteri Dalam Darah Mencit (*Mus musculus*) yang Diinfeksi *Staphylococcus aureus*

Menyatakan dengan sebenarnya bahwa tugas akhir atau skripsi yang saya tulis ini benar-benar merupakan karya saya sendiri, bukan merupakan pengambil alihan data, tulisan atau pikiran orang lain yang saya akui sebagai hasil tulisan atau pikiran saya sendiri, kecuali dengan mencantumkan sumber cuplikan pada daftar pustaka. Apabila dikemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan tugas akhir atau skripsi ini hasil jiplakan, maka saya siap menerima sanksi atas perbuatan tersebut.

Malang, 27 Desember 2019

Yang membuat pernyataan,



Aulia Nur Kumala Dewi

NIM. 13620054

MOTTO

**Percayalah bahwa Allah selalu memberikan
“KEMUDAHAN”
dalam setiap urusan hamba-Nya**



HALAMAN PERSEMBAHAN

Dengan mengucapkan syukur Alhamdulillah kepada Allah SWT dan sholawat kepada baginda Rosululloh SAW

Karya kecil dengan secuil pengetahuan ini saya dedikasikan untuk agama dan ilmu pengetahuan khususnya dalam bidang biologi dan persembahan yang istimewa untuk:

Kedua orang tua yang luar biasa yaitu Abah Drs. Ahmad Su'ud dan Umi Isti hayati, motivator terbesar dan terhebat dalam hidupku yang tiada hentinya mendoakan dan memberi kasih sayang, cinta, semangat dan motivasi. Terima kasih atas segala pengorbanan, dukungan moril maupun materil serta kesabaran untuk mengantarku sampai saat ini. Tanpa Ridho dan doa kalian Allah tak akan memudahkan langkahku dalam menimba ilmu

Untuk suamiku tercinta Muhammad Syafiq Mughni yang senantiasa mengingatkan dan menguatkan ketika malas dan lelah, yang telah memberiku kelonggaran waktu sehingga tugas akhir dapat terselesaikan. Buah hatiku Aslan Arsyadinata Tsaqib, terima kasih karna selalu bertingkah lucu dan menghibur di saat lelah, yang selalu baik ceria dan kompak menemani Bunda untuk selalu semangat dan kuat dalam menyelesaikan tugas akhir

Adikku Berliana Nur Firdaus dan Sofi Nur Fajariyah yang selalu membantu, mendoakan dan memberi semangat

Dan tak lupa terima kasih tak terkira untuk semua keluarga besar, para Kyai dan Ibu Nyai Pondok Pesantren Darul 'Ulum, bapak-ibu guru, bapak-ibu dosen yang telah mengajarkan berbagai ilmu, serta untuk semua sahabat dan teman-teman seperjuangan semoga sukses selalu dan senantiasa istiqomah dalam kebaikan.

KATA PENGANTAR



Alhamdulillah robbil ‘alamin. Segala puji hanya milik Allah SWT sang Maha Kuasa, Maha Pemberi Petunjuk, atas segala nikmat, rahmat dan izin-Nya sehingga skripsi ini dapat diselesaikan. Sholawat serta salam tetap tercurahkan kepada Baginda Rasulullah SAW. Penyusunan karya kecil ini memang tidaklah mudah bagi penulis yang minim ilmu pengetahuan dengan begitu banyak. Akan tetapi segala sesuatu yang telah dimulai harus diselesaikan dengan sebaik mungkin karena Allah SWT tidak ada hentinya untuk senantiasa memberi petunjuk-Nya untuk membimbing dan mengarahkan serta memberi kekuatan untuk hamba-Nya. Dengan keyakinan dan semangat inilah penulis tetap berjuang dan terus berusaha meski sedikit demi sedikit untuk menyelesaikan karya ini.

Penyusunan dan penyelesaian skripsi ini tentu tidak lepas dari bimbingan, bantuan, saran, kritikan dan dukungan dari berbagai pihak karena kekurangan dan keterbatasan pengetahuan penulis. Oleh karena itu pantaslah kiranya penulis haturkan *jazakumullah khairan katsiran wa jazakumullah ahsanal jaza’* kepada:

1. Abah Su’ud dan Ibu Isti kedua orang tua hebat dan tak kenal putus asa yang selalu memotivasi penulis. Semoga Allah membalas kebaikan beliau berdua dan memberikan tempat yang mulia di surga-Nya kelak. Suami tercinta Mas Syafiq dan Anakku tersayang Aslan, Dek Berliana dan Dek Sofi serta semua keluarga besar yang selalu memotivasi penulis.
2. Prof. Dr. Abdul Haris, M.Ag selaku Rektor Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim. Semoga beliau menjadi pemimpin yang dapat dijadikan suri tauladan bagi semua.
3. Dr. Sri Harini, M.Si selaku Dekan Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang. Semoga beliau selalu diberi kekuatan untuk memimpin fakultas dengan baik.
4. Romaidi, M.Si, D.Sc selaku Ketua Jurusan Biologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang yang menjabat selama penulis menempuh studi. Semoga beliau dapat memajukan Biologi ke depannya.
5. Prof. Dr. H. Mudjia Raharjo, M.Si, Dr. drh. Hj. Bayyinatul Muchtaromah, M.Si dan Dr. Evika Sandi Savitri, M.P yang telah memberikan ilmu kepada penulis semoga Allah selalu melindungi beliau.
6. Dr. Hj. Retno Susilowati, M.Si selaku dosen pembimbing I dan Umaiyyatus Syarifah, M.A. selaku dosen pembimbing II (Pembimbing agama). Terima kasih atas semua ilmu, bimbingan, kritik, saran dan kesabaran beliau dalam menuntun penulis dalam menyelesaikan skripsi ini.
7. drg. Anik Listyana, M.Biomed dan Dr. Hj. Ulfah Utami, M.Si selaku dosen penguji yang telah memberikan ilmu, kritik dan saran yang membangun sehingga membantu penyelesaian skripsi ini.

8. Dr. Dwi Suheriyanto, S.Si, M.P selaku dosen wali penulis yang selalu memotivasi dan memberikan saran sehingga membantu proses penyelesaian skripsi ini.
9. Muhammad Basyaruddin, M.Si selaku laboran Fisiologi Hewan yang telah banyak membantu penulis dan tim selama penelitian. Terimakasih atas ilmu dan bimbingannya semoga Allah membalas dengan balasan yang terbaik.
10. Seluruh Dosen, Laboran dan Staf Administrasi Jurusan Biologi yang telah membantu dan memberikan kemudahan, terimakasih atas semua ilmu dan bimbingannya.
11. Meike Tiya Kusuma dan Vicky Felistiani Mahmudah selaku teman satu tim penelitian yang sama-sama belajar, berjuang, berusaha, membantu untuk menyelesaikan skripsi ini. Terimakasih atas pengalaman yang kalian berikan semoga Allah selalu memberi kalian jalan yang terbaik menuju kesuksesan.
12. Tami sebagai teman sekamar, Childa, Manyo, Puput, Anandut, Izza, Ticil, Anis, Desy sebagai teman-teman terdekat penulis yang selalu memberikan motivasi dalam penyelesaian skripsi ini. Semoga Allah selalu memberikan ridho di setiap langkah kalian.
13. Teman-teman Keluarga Besar Biologi B, terimakasih telah menjadi sahabat bahkan keluarga selama penulis menempuh studi. Kebersamaan, kekompakan, canda, tawa dan tangis kalian yang menghiasi perjalanan menuju S.Si.
14. Seluruh teman-teman Jurusan Biologi angkatan 2013, yang berjuang bersama-sama menyelesaikan laporan sampai menyelesaikan skripsi dan menyelesaikan studi sampai memperoleh gelar S.Si
15. Semua pihak yang tidak bisa disebutkan satu per satu yang ikut membantu dan memberikan dukungan baik moril maupun materiil dalam menyelesaikan skripsi ini.

Semoga kebaikan dibalas dengan hadiah yang istimewa dari Allah SWT. Penulis berharap semoga skripsi ini dapat memberi manfaat bagi penulis khususnya dan bagi para pembaca pada umumnya serta dapat menambah khasanah ilmu pengetahuan. Semoga Allah SWT senantiasa memberikan ilmu yang bermanfaat dan melimpahkan rahmat serta ridlo-Nya. Aamiin.

Malang, 26 November 2019

Penulis

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PERSETUJUAN	ii
HALAMAN PENGESAHAN.....	iii
HALAMAN PERNYATAAN.....	iv
HALAMAN MOTTO	v
HALAMAN PERSEMBAHAN	vi
KATA PENGANTAR.....	vii
DAFTAR ISI.....	ix
DAFTAR TABEL	xii
DAFTAR GAMBAR.....	xiii
DAFTAR LAMPIRAN	xiv
ABSTRAK	xv
ABSTRACT	xvi
مختص البحث.....	xvii
BAB I PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	10
1.3 Tujuan.....	11
1.4 Hipotesis.....	11
1.5 Manfaat Penelitian.....	11
1.6 Batasan Masalah.....	12
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	
2.1 Alpukat (<i>Persea americana</i> Mill.).....	14
2.1.1 Deskripsi dan Klasifikasi Alpukat (<i>Persea americana</i> Mill.).....	14
2.1.2 Karakteristik dan Morfologi Alpukat (<i>Persea americana</i> Mill.)	17
2.1.3 Varietas Alpukat (<i>Persea americana</i> Mill.)	19
2.1.4 Biji Alpukat (<i>Persea americana</i> Mill.).....	20

2.1.5 Manfaat Biji Alpukat (<i>Persea americana</i> Mill.)	21
2.1.6 Kandungan Fitokimia Biji Alpukat (<i>Persea americana</i> Mill.)	25
2.1.7 Manfaat Biji Alpukat (<i>P. americana</i> Mill.) sebagai Antibakteri.....	27
2.1.8 Manfaat Biji Alpukat (<i>P. americana</i> Mill.) sebagai Imunomodulator	31
2.2 Ekstraksi.....	32
2.2.1 Pengertian Ekstraksi	32
2.2.2 Pelarut untuk Ekstraksi.....	34
2.2.3 Maserasi.....	35
2.3 Bakteri <i>Staphylococcus aureus</i>	35
2.3.1 Karakteristik dan Morfologi.....	35
2.3.2 Klasifikasi Bakteri <i>Staphylococcus aureus</i>	37
2.3.3 Patogenitas.....	37
2.3.4 Faktor Virulensi Bakteri <i>Staphylococcus aureus</i>	39
2.4 Perhitungan Jumlah Koloni Bakteri Metode Cawan.....	43
2.5 Sistem Imunitas.....	45
2.6 Sitokin	48
2.6.1 Definisi Sitokin.....	48
2.6.2 Interleukin 10 (IL-10).....	49
2.7 <i>Enzim-linked Immunosorbent Assay (ELISA)</i>	51
2.7.1 Definisi <i>ELISA</i>	51
2.7.2 Jenis Teknik <i>ELISA</i>	53

BAB III METODE PENELITIAN

3.1 Rancangan Penelitian.....	55
3.2 Populasi dan Sampel	55
3.3 Variabel Penelitian.....	56
3.4 Waktu dan Tempat.....	57
3.5 Alat dan Bahan.....	58
3.5.1 Alat	58
3.5.2 Bahan	58
3.6 Waktu dan Tempat Pelaksanaan Kegiatan Penelitian.....	58

3.7	Prosedur Penelitian	59
3.7.1	Aklimatisasi Hewan Coba	59
3.7.2	Persiapan Ekstrak Biji Alpukat (<i>Persea americana</i> Mill.).....	59
3.7.3	Persiapan Bakteri <i>Staphylococcus aureus</i>	60
3.7.4	Injeksi dan Uji Konfirmasi <i>Staphylococcus aureus</i>	63
3.7.5	Pemberian Terapi Ekstrak	67
3.7.6	Pemberian dan Penentuan Dosis Ceftobiprole	67
3.7.7	Pengambilan Sampel Darah.....	67
3.7.8	Perhitungan Jumlah Bakteri dalam Darah	68
3.7.9	Pemeriksaan Kadar IL-10.....	68
3.8	Analisis Data	69
 BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN		
4.1	Pengaruh Ekstrak Etanol Biji Alpukat (<i>Persea americana</i> Mill.) terhadap Kadar Sitokin IL-10	71
4.2	Pengaruh Ekstrak Etanol Biji Alpukat (<i>Persea americana</i> Mill.) terhadap Jumlah Bakteri <i>Staphylococcus aureus</i> dalam Darah	82
 BAB V PENUTUP		
5.1	Kesimpulan	96
5.2	Saran	96
 DAFTAR PUSTAKA		97
LAMPIRAN.....		107

DAFTAR TABEL

Tabel 2.1 Karakteristik <i>P. americana</i> Mill. varietas hijau panjang dan <i>P. americana</i> Mill. varietas hijau bundar	20
Tabel 2.2 Senyawa Fitokimia dari Daun, Buah, dan Biji Alpukat (mg/100 g)	26
Tabel 2.3 Kandungan Fitokimia Ekstrak Biji Alpukat (<i>P. americana</i> Mill.) dengan Berbagai Pelarut.....	26
Tabel 2.4 Penentuan Aktivitas Antimikroba Ekstrak Biji Alpukat (<i>P. americana</i> Mill.)	27
Tabel 4.1 Hasil Perhitungan Rata-Rata Kadar Sitokin IL-10 dan Standart Deviasi.....	74
Tabel 4.2 Hasil Perhitungan Rata-Rata Jumlah Bakteri <i>S.aureus</i> dalam Darah dan Standart Deviasi	88
Tabel 4.3 Hasil Uji Lanjut <i>Games-Howel</i>	90

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1. Morfologi tanaman alpukat (<i>P. americana</i> Mill.).....	19
Gambar 2.2 Bakteri <i>S.aureus</i>	37
Gambar 4.1 Diagram Rata-Rata Kadar Sitokin IL-10 dalam Darah Mencit....	74
Gambar 4.2 Hasil Uji Konfirmasi Keberadaan <i>S. aureus</i> dalam Darah Mencit setelah Dijeksi <i>S. aureus</i> (sebelum perlakuan.....	83
Gambar 4.3 Hasil Uji Koagulase	85
Gambar 4.4 Hasil Pertumbuhan Bakteri <i>S.aureus</i> pada Media MSA Setelah Perlakuan	86
Gambar 4.5 Diagram Rata-Rata Jumlah Koloni Bakteri <i>S.aureus</i> dalam Darah	89



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Alur Penelitian	107
Lampiran 2. Perhitungan Dosis.....	108
Lampiran 3. Perhitungan Jumlah Koloni Bakteri <i>S.aureus</i> dalam darah.....	110
Lampiran 4. Nilai Rata-Rata dan Standart Deviasi Juumlah Koloni Bakteri dalam Darah (SPSS)	111
Lampiran 5. Hasil Uji Statistik dengan SPSS Jumlah Koloni dalam Darah....	112
Lampiran 6. Hasil Uji Statistik dengan SPSS Kadar IL-10 dalam Darah.....	114
Lampiran 7. Dokumentasi Alat Penelitian	116
Lampiran 8. Dokumentasi Bahan Penelitian.....	119
Lampiran 9. Dokumentasi Proses Penelitian	121
Lampiran 10. Bukti Konsultasi Dosen Pembimbing Biologi.....	125
Lampiran 11. Bukti Konsultasi Dosen Pembimbing Agama	126
Lampiran 12. Form Checklist Plagiasi.....	127

Uji Aktivitas Ekstrak Etanol Biji Alpukat (*Persea americana* Mill.) terhadap Kadar IL-10 dan Jumlah Bakteri dalam Darah Mencit (*Mus musculus*) yang Diinfeksi *Staphylococcus aureus*

Aulia Nur Kumala Dewi, Dr. Hj. Retno Susilowati, M.Si,
Umairatus Syarifah M.A.

ABSTRAK

Bakteri *Staphylococcus aureus* merupakan jenis bakteri gram positif yang bersifat invasif dan dapat menyebabkan kerusakan organ dan berbagai jenis penyakit termasuk salah satunya adalah sepsis yang terkait dengan bakteremia. Adapun untuk memastikan adanya bakteremia dapat dilakukan dengan pemeriksaan jumlah koloni bakteri yang ada dalam darah secara *in vivo* serta melakukan pemeriksaan kadar sitokin sebagai respon yang timbul akibat adanya antigen berupa bakteri. Infeksi *S. aureus* menjadi cukup serius karena meningkatnya resistensi terhadap beberapa antibiotik, sehingga mendorong adanya pengobatan alternatif yang berasal dari bahan alam salah satunya dari biji alpukat (*P. americana* Mill.). biji alpukat mengandung berbagai jenis metabolit sekunder seperti saponin, tanin, flavonoid, alkaloid, dan fenol yang memiliki potensi sebagai antibakteri serta mampu meningkatkan sistem imunitas. dalam penelitian ini dilakukan untuk mengetahui aktivitas ekstrak etanol biji alpukat terhadap jumlah bakteri dalam darah dan kadar sitokin IL-10. Penelitian ini bersifat eksperimental menggunakan rancangan acak lengkap (RAL) dengan 5 perlakuan dan 5 ulangan yang terdiri dari normal (tanpa infeksi *S. aureus*, tanpa terapi), kontrol positif (diinfeksi *S. aureus*, diberi antibiotik helixim), P0 (diinfeksi *S. aureus*, tanpa terapi), P1 (diinfeksi *S. aureus*, terapi ekstrak biji alpukat dosis 600 mg/kg) dan P2 (diinfeksi *S. aureus*, terapi ekstrak biji alpukat dosis 1200 mg/kg). Analisis data menggunakan ANOVA dengan $\alpha=5\%$ dan hasil yang signifikan dilanjutkan dengan uji *Duncan*. Hasil uji ANOVA menunjukkan bahwa ekstrak etanol biji alpukat tidak ada pengaruh yang signifikan terhadap jumlah koloni bakteri dalam darah ($p=0,279$) dan juga tidak berpengaruh terhadap kadar sitokin IL-10 ($p=0,91$)

Kata kunci: Biji alpukat (*P. americana* Mill.), Sitokin IL-10, Bakteri *Staphylococcus aureus*

An activity test of the ethanol extract of avocado seeds (*Persea americana* Mill.) against IL-10 levels and the number of bacteria in the blood of mice (*Mus musculus*) infected by *Staphylococcus aureus*

Aulia Nur Kumala Dewi, Dr. Hj. Retno Susilowati, M.Sc.
Mujahidin Ahmad M.Sc

ABSTRACT

Staphylococcus aureus bacteria is a type of invasive and positive gram- bacteria and can cause organ damage and the types of diseases, one of it is sepsis that is associated with bacteremia. To ensure the bacteremia can be done by examining the number of bacterial colonies in the blood through in vivo as well as examining cytokine levels as a response to the presence of antigens in the form of bacteria. *S. aureus* infection becomes quite serious due to increased resistance to several antibiotics, thus encouraging alternative treatments that are derived from natural materials, one of which is avocado seeds (*P. americana* Mill.). Avocado seeds contain various types of secondary metabolites, such as saponins, tannins, flavonoids, alkaloids, and phenols which have potential as an antibacterial and are able to enhance the immune system. The research was conducted to determine the activity of ethanol extract of avocado seeds against the number of bacteria in the blood and IL-10 cytokine levels. The research was experimental by using a completely randomized design (CRD) with 5 treatments and 5 replications consisting of normal (without *S. aureus* infection, without therapy), positive control (infected with *S. aureus*, given antibiotic *helixim*), P0 (infected with *S. aureus*, without therapy), P1 (infected by *S. aureus*, extract therapy of avocado seeds at a dose of 600 mg/kg) and P2 (infected with *S. aureus*, extract at a dose of 1200 mg/kg). Data analysis used ANOVA with $\alpha = 5\%$, and significant results were continued with Duncan's test. ANOVA test results showed that the ethanol extract of avocado seeds had no significant effect on the number of bacterial colonies in the blood ($p = 0.279$) and also on cytokine levels of IL-10 ($p = 0.91$)

Keywords: Avocado seeds (*P. americana* Mill.), Cytokines IL-10, *Staphylococcus aureus* bacteria

**اختبار نشاط لاستخراج الايثانول لبذرة الأفوكادو (*Persea americana Mill.*) على مستوى IL-10
وعدد البكتيريا في الدم الفئران (*Mus musculus*) المصاب بالمكورات العنقودية الذهبية
(*Staphylococcus aureus*)**

أوليا نور كومالا ديوي، الدكتورة رتنو سوسيلواتي، الحجة الماجستير، وأميرة الشريفة، الماجستير

ملخص البحث

بكتيريا المكورات العنقودية الذهبية هي نوع من البكتيريا الجرام الإيجابية غازية والتي يمكن أن تتسبب في تلف الأعضاء وأنواع الأمراض المختلفة، واحدة منها هي تعفن الدم المرتبط بكثير الدم أو وجود البكتيريا في مجرى الدم. لضمان وجود البكتيريا في مجرى الدم يمكن أن يستخدم طريق فحص عدد المستعمرات البكتيرية في الدم في الجسم الحي (*in vivo*) والتحقق من مستويات السيتوكينات كاستجابة ناشئة عن وجود مستضدات في شكل بكتيريا. تصبح عدوى المكورات العنقودية الذهبية خطيرة جدا بسبب زيادة المقاومة على المضادات الحيوية، التي تشجع العلاجات البديلة المشتقة من المواد الطبيعية، واحدة منها هي بذور الأفوكادو (*P. americana Mill.*) تحتوي بذور الأفوكادو على أنواع مختلفة من المستقلبات الثانوية مثل الصابونين والتانين والفلافونويد والقلويدات والفينولات التي يحتمل أن تكون مضادة للجراثيم وتقدر أن تعزز الجهاز المناعي. في هذا البحث، لتحديد نشاط لاستخراج الايثانول لبذرة الأفوكادو على عدد البكتيريا في الدم ومستويات السيتوكين IL-10. كان هذا البحث تجريبية باستخدام تصميم عشوائي تمامًا (CRD) مع 5 علاجات و 5 تكريرات التي تتكون من الطبيعي (بدون عدوى المكورات العنقودية الذهبية، بدون علاج)، ومراقبة إيجابية (المصاب بالبكتيريا المكورات العنقودية الذهبية، أعطيت المضادات الحيوية هيليكسيم، (P0) المصاب بالمكورات العنقودية الذهبية، بدون علاج (P1) المصاب بالبكتيريا المكورات العنقودية الذهبية، علاج استخراج بذور الأفوكادو بجرعة 600 ملغ/كغ) و (P2) المصاب بالبكتيريا المكورات العنقودية الذهبية، علاج استخراج بذور الأفوكادو بجرعة 1200 ملغ/كغ. تحليل البيانات هو باستخدام أنوفا مع $\alpha=5\%$ واستمر النتائج الهامة مع اختبار دنكان. دلت نتائج اختبار أنوفا أن استخراج الايثانول لبذور الأفوكادو لم يؤثر كبيرا على عدد المستعمرات البكتيرية في الدم ($p=0,279$) وأيضًا لم يؤثر على مستويات السيتوكين IL-10 ($p=0,91$)

الكلمات الرئيسية: بذور الأفوكادو (*P. americana Mill.*)، السيتوكينات IL-10، بكتيريا المكورات العنقودية الذهبية (*Staphylococcus aureus*)

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Masalah kesehatan adalah suatu masalah kompleks yang merupakan hasil dari berbagai masalah lingkungan yang bersifat alamiah maupun buatan manusia. Timbulnya penyakit merupakan suatu hal yang tidak bisa ditolak, namun dapat dicegah ataupun dihindari. Penyakit itu sendiri berdasarkan penyebabnya dibagi menjadi dua yaitu penyakit infeksius dan non infeksius. Adapun penyakit infeksius merupakan jenis penyakit yang disebabkan oleh adanya infeksi yang menyerang tubuh seperti contoh karena terserang bakteri, sedangkan penyakit non infeksius merupakan jenis penyakit yang penyebabnya terjadi diluar infeksi dan dapat disebabkan karena beberapa faktor seperti faktor genetik dan gaya hidup.

Menurut Darmadi (2008), penyakit infeksi merupakan penyebab paling utama tingginya angka kesakitan (*morbidity*) dan angka kematian (*mortality*) terutama pada negara-negara berkembang seperti halnya Indonesia. Jawetz (2007) menjelaskan bahwa penyakit infeksi dapat disebabkan oleh berbagai mikroorganisme seperti bakteri, virus, jamur dan protozoa. Penyakit infeksi merupakan salah satu jenis penyakit yang dapat melemahkan sistem pertahanan tubuh inang. Menurut WHO (2014), profil data kesehatan Indonesia pada tahun 2012 menunjukkan bahwa penyakit infeksi termasuk dalam 10 besar penyakit dengan tingkat kematian yang cukup tinggi. Jawetz (2007) menjelaskan bahwa penyebab penyakit infeksi yang paling sering ditemui adalah bakteri dan salah satu contohnya adalah *Staphylococcus aureus*.

Bakteri *S. aureus* juga merupakan salah satu penyebab utama penyakit infeksi di rumah sakit dan masyarakat pada umumnya (Naimi dkk, 2003). Selain itu, bakteri ini juga menjadi indikator pada pengujian makanan, minuman, obat tradisional dan kosmetika di Badan Pengawas Obat dan Makanan sehingga infeksi yang ditimbulkan oleh bakteri *S. aureus* merupakan suatu infeksi yang tidak bisa dianggap remeh.

Staphylococcus aureus merupakan bagian dari mikroflora normal pada manusia, namun, pada kondisi tertentu dapat menyebabkan infeksi yang signifikan (Wadvogel, 1995 dalam Selimovic, 2015). Menurut Vasanthakumari (2007) menjelaskan bahwa keseimbangan flora normal harus selalu dijaga sebab apabila keseimbangannya terganggu maka flora normal dapat menjadi patogen oportunistik. Sistem imun yang terganggu bahkan menurun juga dapat mengakibatkan bakteri flora normal menjadi patogen. Selain itu, tindakan medis di rumah sakit seperti pemasangan kateter, injeksi obat dan lain sebagainya yang tidak dilakukan sesuai prosedur juga dapat menjadi gerbang masuknya flora normal sehingga jumlah flora normal dalam tubuh pun bertambah dan dapat menyebabkan infeksi *nosokomial*. Pengobatan antibiotik dari jenis *broad spectrum* juga dapat memusnahkan semua jenis bakteri termasuk flora normal sehingga flora normal yang ada dapat mati dan muncul bakteri yang bersifat patogen.

Menurut Synder (2001) dalam Rachmawati (2008), flora normal pada umumnya tidak bersifat patogen, kecuali *S. aureus*. Dalam jurnal Nakamura, dkk (2013) dijelaskan bahwa injeksi bakteri *S. aureus* dengan jumlah 10^8 koloni

telah terbukti dapat menyebabkan infeksi pada kulit bahkan toksin yang dihasilkan dapat menyebar ke seluruh tubuh sehingga menyebabkan penyakit yang lebih berbahaya.

Hampir setiap individu pernah mengalami infeksi akibat *S. aureus* dengan tingkat keparahan yang berbeda dalam hidupnya (Jawetz, 2010). Tingkat keparahan infeksi *S. aureus* mulai dari keracunan makanan, infeksi minor di kulit (furunkulosis dan impetigo), infeksi saluran kencing, infeksi saluran pernapasan, infeksi pada mata hingga *Central Nervous system* (CNS) yang dapat membahayakan nyawa (Afifurrahman, 2014). Adapun beberapa penyakit yang dapat timbul akibat infeksi *S. aureus* antara lain endokarditis, osteomielitis hematogen akut, meningitis, infeksi paru-paru dan sepsis. Tidak hanya itu, *S. aureus* juga dapat mengakibatkan sindrom syok toksik, infeksi folikel rambut serta kontaminasi langsung pada luka seperti luka ringan, luka pasca operasi (Jawetz, 2010).

Staphylococcus aureus merupakan spesies dari genus *Staphylococcus* yang paling patogen bagi manusia (Jawetz, 2007). Infeksi bakteri ini dapat menyerang semua sistem organ pada tubuh. Menurut Gordon (2008) secara *in vitro* *S. aureus* dapat menyerang dan bertahan hidup di dalam sel epitel termasuk sel endotel karena memiliki mekanisme penghindaran sehingga sulit dikenali oleh sistem pertahanan tubuh. Li, dkk (2015) menjelaskan bahwa *S. aureus* dilengkapi dengan berbagai faktor virulensi yang cukup baik seperti mikrokapsul, toksin dan gen resistensi obat yang berkontribusi dalam proses patologi. Tidak hanya itu, bakteri *S. aureus* juga mampu membentuk koloni kecil yang berbeda atau *small-colony*

variants (SCVs) yang menyebabkan infeksi *S. aureus* sulit disembuhkan dan sering terjadi berulang-ulang. Adapun ciri khas infeksi yang disebabkan oleh *S. aureus* adalah radang supuratif (bernanah) pada jaringan lokal dan cenderung menjadi abses. Sedangkan infeksi serius dari *S. aureus* dapat terjadi ketika sistem imun melemah yang disebabkan oleh perubahan hormon, penyakit, luka, penggunaan steroid atau obat lain yang mempengaruhi sistem imun (Afifurrahman, 2014).

Berdasarkan penjelasan di atas maka diketahui bahwa penyakit yang timbul akibat infeksi *S. aureus* cukup kompleks hingga dapat mengganggu semua sistem organ. Melzer (2013) menjelaskan bahwa *S. aureus* adalah salah satu penyebab paling umum *bacteremia* (kondisi dimana bakteri hadir dalam aliran darah dan terkait penyebab sepsis) dengan tingkat kematian lebih tinggi dibandingkan dengan bakteri lain. Untuk memastikan adanya infeksi bakteri dalam tubuh maka salah satu cara untuk mengetahuinya adalah dengan melakukan pemeriksaan jumlah koloni bakteri yang ada dalam darah secara *in vivo* serta melakukan pemeriksaan kadar sitokin sebagai respon yang timbul akibat adanya antigen berupa bakteri. Hal ini sesuai dengan penjelasan Baratawidjaja (2014) bahwa sitokin merupakan kelompok protein (polipeptida) yang diproduksi sebagai respon terhadap rangsangan mikroba dan antigen lainnya dan berperan sebagai mediator pada reaksi imun dan inflamasi.

Li, dkk (2015) menjelaskan bahwa dalam darah, terdapat sel yang berperan sebagai APC (*Antigen presenting cell*) utama yang akan

mempresentasikan antigen. APC tersebut diantaranya adalah monosit, makrofag, dan sel dendritik (DC) yang menghasilkan sitokin berupa interleukin-10 (IL-10) berlimpah akibat infeksi *S. aureus*. Menurut Frodermann, dkk (2011), secara kuantitatif monosit dan makrofag merupakan sumber utama penghasil IL-10 dalam merespon *S. aureus*. Produksi IL-10 oleh monosit dan makrofag antara 4-20 kali lebih tinggi daripada sel dendritik (DC). Li, dkk (2015) juga menjelaskan bahwa produksi IL-10 yang meningkat dapat menunjukkan jumlah koloni yang berlebih.

IL-10 merupakan sitokin antiinflamasi dimana ketika terjadi infeksi, IL-10 akan menghambat aktivitas sel-sel *T-helper* 1 (Th1), sel *Natural Killer* (NK) dan makrofag, semua yang diperlukan untuk pembersihan patogen secara optimal (Couper, 2008). Baratawidjaja (2014) juga menjelaskan fungsi utama IL-10 adalah menghambat produksi beberapa sitokin (TNF, IL-1, IL-12, dan kemokin) dan menghambat fungsi makrofag dalam membantu aktivasi sel T. Hambatan fungsi makrofag terjadi karena IL-10 menekan ekspresi molekul *Major Histocompatibility Complex* (MHC) kelas II terhadap makrofag. Dampak akhir dari aktivasi IL-10 adalah hambatan reaksi inflamasi (antiinflamasi) nonspesifik maupun spesifik yang diperantai sel T.

Berdasarkan penjelasan di atas, ketika suatu inang terinfeksi oleh *S. aureus* dan terjadi hambatan dalam aktivasi sel T serta pembersihan patogen maka dapat berdampak terhadap keberadaan bakteri tersebut dalam darah. Lain halnya jika kemudian dilakukan pemberian terapi melalui senyawa aktif yang terkandung

dalam bahan alam, maka keberadaan bakteri *S. aureus* dalam aliran darah (bakteremia) terkait penyakit sepsis dapat berkurang serta dapat mempengaruhi kadar IL-10 yang diperkirakan akan menurun.

Infeksi akibat *S. aureus* dilihat dari efek yang ditimbulkan termasuk masalah yang cukup serius saat ini. Kumar, dkk (2011) menyatakan bahwa infeksi *S. aureus* saat ini meningkat karena adanya resistensi bakteri terhadap berbagai jenis antibiotik (*Multi Drug Resistance/MDR*). *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus* (MRSA) merupakan jenis bakteri *S. aureus* yang resisten terhadap antibiotik β -laktam, termasuk methicillin, oxacillin, nafcillin, dan cephalosporin. Antibiotik hanya membunuh atau menghambat bakteri yang sensitif terhadap antibiotik tersebut (Horowitz, 2005). Hal ini menyebabkan seleksi strain yang resisten hingga akhirnya penggunaan antibiotik menjadi tidak efektif sehingga diperlukan alternatif lain sebagai pengganti antibiotik. Alternatif lain yang dapat digunakan adalah penggunaan bahan alami sebagai upaya pencegahan maupun pengobatan terhadap penyakit infeksi.

Penggunaan bahan alami telah banyak digunakan oleh masyarakat sebagai salah satu upaya untuk menanggulangi masalah kesehatan. Salah satu bahan alami tersebut dapat bersumber dari tumbuhan. Beberapa tumbuhan mengandung bahan aktif penting terutama senyawa metabolit sekunder dengan struktur-struktur yang unik dan bervariasi. Hal tersebut merupakan suatu kebesaran dan kekuasaan Allah SWT yang telah menciptakan segala sesuatu beserta manfaatnya, sehingga untuk mengetahui lebih mendalam mengenai segala ciptaan Allah maka perlu dilakukan suatu penelitian.

As-Shiddieqy (2000) menjelaskan bahwa sesungguhnya alam ini adalah laboratorium besar yang diciptakan Allah untuk kegiatan penelitian, berupa tafakur mengenal *sunnatullah* yaitu tentang fenomena alam. Sebagai contoh, sebelum seorang ilmuwan memulai suatu proyek baru, biasanya para ilmuwan mencari model pada makhluk hidup dan meniru sistemnya. Dengan kata lain, ilmuwan mengamati dan mempelajari rancangan-rancangan yang diciptakan Allah di alam, sehingga para ilmuwan dapat mengembangkan keilmuannya.

Pemanfaatan tumbuhan yang berpotensi untuk menanggulangi masalah kesehatan menunjukkan bukti kekuasaan Allah SWT bahwa tidak ada suatu hal yang diciptakan sia-sia tanpa memiliki manfaat. Secara tersirat juga telah dijelaskan dalam al-Qur'an bahwa sesungguhnya segala sesuatu yang diciptakan Allah SWT memiliki kelebihan dan manfaat tersendiri. Adapun ayat al-Qur'an yang menjelaskan tentang hal tersebut ada dalam Surat As-Syu'ra (26) ayat 7-8 sebagai berikut:

أَوَلَمْ يَرَوْا إِلَى الْأَرْضِ كَمْ أَنْبَتْنَا فِيهَا مِنْ كُلِّ زَوْجٍ كَرِيمٍ ﴿٧﴾
 إِنَّ فِي ذَلِكَ لَآيَةً وَمَا كَانَ أَكْثَرُهُمْ مُؤْمِنِينَ ﴿٨﴾

Artinya: “Dan apakah mereka tidak memperhatikan bumi, berapakah banyaknya *Kami* tumbuhkan di bumi itu **berbagai macam tumbuh-tumbuhan yang baik**? Sesungguhnya pada yang demikian itu benar-benar **terdapat suatu tanda kekuasaan Allah**. Dan kebanyakan mereka tidak beriman” (Q.S As-Syu'ra (26): 7-8).

Ayat di atas apabila dianalisa lebih dalam, terdapat makna tersirat bahwa telah diciptakan berbagai macam tumbuh-tumbuhan yang mengandung berbagai senyawa aktif dan bermanfaat bagi kehidupan manusia. Ditinjau dari segi

tafsirnya, Lafadz كَرِيم memiliki arti baik dan mulia. Lafadz tersebut dapat digunakan untuk menggambarkan segala sesuatu yang baik bagi setiap objek yang disifatinya. Dalam tafsir ini diartikan bahwa tumbuhan yang baik adalah tumbuhan yang subur serta memiliki manfaat, dan Allah SWT telah menumbuhkan berbagai tumbuhan yang baik di atas muka bumi ini (Shihab, 2002). Banyak manfaat yang dapat diambil dari tumbuhan seperti halnya untuk menyembuhkan beberapa jenis penyakit. Salah satu tumbuhan yang memiliki khasiat untuk pengobatan penyakit adalah alpukat (*Persea americana* Mill.) baik daun, buah maupun bijinya.

Pemanfaatan biji alpukat (*P. americana*) berdasarkan kandungan senyawa fitokimianya secara tersirat juga telah dijelaskan dalam al-Qur'an Surat Al-An'am (6) ayat 95 sebagai berikut:

إِنَّ اللَّهَ فَالِقُ الْحَبِّ وَالنَّوَىٰ ۖ يُخْرِجُ الْحَيَّ مِنَ الْمَيِّتِ وَمُخْرِجُ الْمَيِّتِ مِنَ الْحَيِّ ۗ
ذَٰلِكُمْ اللَّهُ فَالِقُ الْحَبِّ وَالنَّوَىٰ ۗ فَآتَىٰ تُوَفَّكُونَ ﴿٩٥﴾

Artinya: “*Sesungguhnya Allah menumbuhkan butir tumbuh-tumbuhan dan biji buah-buahan. Dia mengeluarkan yang hidup dari yang mati dan mengeluarkan yang mati dari yang hidup. (Yang memiliki sifat-sifat) demikian ialah Allah, maka mengapa kamu masih berpaling?*” (Q.S Al-An'am (6): 95).

Ayat di atas menjelaskan bahwa “Allah telah mengularkan yang hidup dari yang mati dan mengeluarkan yang mati dari yang hidup” berdasarkan tafsir Ibnu Katsir makna ayat tersebut dapat di analogikan dengan Allah menciptakan tumbuhan (hidup) dan darinya dikeluarkan sesuatu yang mati seperti senyawa-senyawa fitokimia. Berdasarkan ayat-ayat di atas, maka telah jelas bahwa sesungguhnya dalam suatu tanaman terdapat berbagai macam manfaat. Hal ini

sangat berhubungan dengan pemanfaatan biji alpukat (*P. americana*) sebagai salah satu tumbuhan yang memiliki potensi sebagai obat suatu penyakit.

Biji alpukat (*P. americana*) dilaporkan mempunyai aktivitas antioksidan yang tinggi (Malangngi dkk, 2012). Selain itu, Arukwe dkk, (2012) melaporkan bahwa hasil dari penafsiran senyawa fitokimia dalam setiap 100 gram daun, buah, dan biji tanaman alpukat (*P. americana*) mengandung senyawa saponin, tanin, flavonoid, alkaloid, dan fenol dengan kandungan tertinggi untuk saponin, alkaloid, dan fenol terdapat dalam biji alpukat (*P. americana*).

Ilozue dkk, (2014) melaporkan bahwa telah dilakukan *screening* fitokimia terhadap ekstrak biji alpukat (*P. americana*) menggunakan berbagai pelarut. Hasil yang diperoleh dari pemberian ekstrak biji alpukat (*P. americana*) secara *in vitro* pada 3 jenis bakteri yaitu *S. aureus*, *Salmonella thypi*, dan *Escherchia coli* terbukti bahwa ekstrak biji alpukat (*P. americana*) mampu menghasilkan zona hambat terbesar pada bakteri *S. aureus*. Dengan demikian, secara *in vitro* ekstrak biji alpukat (*P. americana*) telah terbukti mampu menghambat pertumbuhan *S. aureus* akan tetapi penelitian yang mengarah secara *in vivo* masih jarang dilakukan.

Penelitian ini menggunakan ekstrak biji alpukat (*P. americana*) untuk meningkatkan sistem imun mencit jantan Galur Balb/c yang diinfeksi bakteri *S. aureus* dengan memeriksa kadar sitokin IL-10. Biji alpukat (*P. americana*) mengandung senyawa saponin paling tinggi dibandingkan bagian daun dan buahnya. Saponin memiliki manfaat sebagai antiinflamasi, antibakteri dan antikarsinogenik (Ilozue dkk, 2014). Menurut penjelasan Francis (2001) dalam Kurnianingtyas (2013), saponin dalam jumlah normal berperan sebagai

immunostimulator, sedangkan dalam jumlah yang melebihi batas normal saponin akan berperan sebagai immunosupresor (zat yang menekan atau menurunkan sistem imun). Adapun dosis yang digunakan mengacu pada penelitian Sutrisna (2015) bahwa dosis aman biji alpukat adalah 300 sampai 1200 mg/ kgBB/hari.

Selain itu, dalam penelitian ini juga memeriksa jumlah koloni bakteri yang ada dalam darah untuk membandingkan jumlah koloni bakteri sebelum dan sesudah pemberian terapi ekstrak etanol biji alpukat (*P. americana*). Penggunaan pelarut dari jenis etanol dalam pembuatan ekstrak biji alpukat (*P. americana*) mengacu pada penelitian Parameswaran, dkk (2014) yang meneliti tentang senyawa aktif dalam alpukat (*P. americana*) menggunakan berbagai pelarut. Dalam penelitian tersebut diketahui bahwa dengan menggunakan pelarut etanol jumlah senyawa aktif jenis saponin lebih banyak diperoleh.

1.2 Rumusan Masalah

Rumusan masalah dalam penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Adakah pengaruh pemberian ekstrak biji alpukat (*Persea americana* Mill.) terhadap kadar IL-10 pada mencit yang diinfeksi *Staphylococcus aureus*?
2. Adakah pengaruh pemberian ekstrak biji alpukat (*Persea americana* Mill.) terhadap jumlah koloni bakteri dalam darah mencit yang diinfeksi *Staphylococcus aureus*?

1.3 Tujuan

Tujuan dalam penelitian ini adalah untuk:

1. Mengetahui pengaruh pemberian ekstrak biji alpukat (*Persea americana* Mill.) terhadap kadar IL-10 pada mencit yang diinfeksi *Staphylococcus aureus*
2. Mengetahui pengaruh pemberian ekstrak biji alpukat (*Persea americana* Mill.) terhadap jumlah koloni bakteri dalam darah mencit yang diinfeksi *Staphylococcus aureus*

1.4 Hipotesis

Hipotesis dalam penelitian ini adalah:

- H₀ = Ada pengaruh pemberian ekstrak biji alpukat (*Persea americana* Mill.) terhadap kadar IL-10 dan jumlah koloni bakteri dalam darah mencit yang diinfeksi *Staphylococcus aureus*.
- H₁ = Tidak ada pengaruh pemberian ekstrak biji alpukat (*Persea americana* Mill.) terhadap kadar IL-10 dan jumlah koloni bakteri dalam darah mencit yang diinfeksi *Staphylococcus aureus*.

1.5 Manfaat

Manfaat dari penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Berpartisipasi dalam pengembangan dan kemajuan di bidang Ilmu Pengetahuan dan Teknologi khususnya di bidang Ilmu Biologi.
2. Memberikan alternatif pengobatan dengan menggunakan biji alpukat (*Persea americana* Mill.).

3. Memberikan informasi tentang mekanisme penghambatan infeksi *Staphylococcus aureus* oleh pemberian ekstrak biji alpukat (*Persea americana* Mill.).

1.6 Batasan Masalah

Batasan masalah dalam penelitian ini adalah:

1. Biji alpukat diperoleh dari perkebunan Alpukat di Dusun Sidolegi, Desa Pangklungan, Kecamatan Wonosalam, Kabupaten Jombang.
2. Biji alpukat yang digunakan berasal dari varietas hujau panjang.
3. Metode ekstraksi menggunakan maserasi dengan pelarut etanol 96% yang dibuat dalam 2 dosis yaitu 600 mg/kg, 1200 mg/kg.
4. Pemberian ekstrak biji dilakukan secara oral menggunakan sonde lambung.
5. Hewan coba yang digunakan adalah mencit.
6. Kriteria hewan coba:
 - a. Berat badan 20-25 gram
 - b. Jenis kelamin jantan
 - c. Usia sekitar 8-12 minggu
 - d. Galur Balb/c
 - e. Mencit dalam keadaan sehat
7. Bakteri yang digunakan adalah isolat *Staphylococcus aureus* yang didapat dari Laboratorium Mikrobiologi Universitas Brawijaya.
8. Injeksi bakteri dilakukan dengan cara injeksi intraperitoneal.
9. Perlakuan yang diberikan bersifat kuratif.

10. Objek yang diamati adalah produksi IL-10 dan jumlah koloni bakteri *Staphylococcus aureus* dalam darah.
11. Sampel yang digunakan adalah darah.
12. Metode yang digunakan adalah secara *in vivo*.



BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Alpukat (*Persea Americana* Mill.)

2.1.1 Deskripsi dan Klasifikasi Alpukat (*Persea Americana* Mill.)

Tumbuhan merupakan salah satu makhluk hidup yang diciptakan Allah SWT sebagai satu di antara bukti-bukti kebesaran dan kekuasaan-Nya. Dengan begitu banyak bukti kebesaran Allah SWT maka dapat mendorong semangat untuk mempelajainya. Allah berfirman dalam al-Qur'an Surat Ar-Ra'd (13): 4 sebagai berikut:

وَفِي الْأَرْضِ قِطْعٌ مُتَجَوِّرَاتٌ وَجَنَّاتٌ مِّنْ أَعْنَابٍ وَزُرْعٌ وَنَخِيلٌ صِنَوَانٌ وَغَيْرُ
 صِنَوَانٍ يُسْقَى بِمَاءٍ وَاحِدٍ وَنُفِضَ لِبَعْضِهَا عَلَى بَعْضٍ فِي الْأَكْلِ إِنَّ فِي ذَلِكَ
 لَآيَاتٍ لِّقَوْمٍ يَعْقِلُونَ ﴿٤﴾

Artinya: “Dan di bumi ini terdapat bagian-bagian yang berdampingan, dan kebun-kebun anggur, tanaman-tanaman dan pohon korma yang bercabang dan yang tidak bercabang, disirami dengan air yang sama. Kami melebihkan sebahagian tanam-tanaman itu atas sebagian yang lain tentang rasanya. **Sesungguhnya pada yang demikian itu terdapat tanda-tanda (kebesaran Allah) bagi kaum yang berfikir**” (Q.S. Ar-Ra'd (13): 4).

Berdasarkan tafsir Ibnu Katsir (2001), makna dari “Terdapat tanda-tanda bagi yang berfikir” yaitu mereka yang mempunyai akal (ulul albab) yang sempurna lagi bersih, yang mengetahui hakikat banyak hal secara jelas dan nyata. Mereka bukan orang tuli dan bisu yang tidak berakal. Ayat di atas memerintahkan umat Islam untuk senantiasa melihat serta merenungkan adanya bentuk tanda-tanda kebesaran Allah SWT melalui ciptaan-Nya dan memikirkan hikmah dibalik

ciptaan Allah SWT salah satunya dalam hal penciptaan tumbuhan yang beraneka ragam.

Adanya keanekaragaman tumbuhan juga dijelaskan dalam al-Qur'an Surat Thaha (20) ayat 53 sebagai berikut:

الَّذِي جَعَلَ لَكُمُ الْأَرْضَ مَهْدًا وَسَلَكَ لَكُمْ فِيهَا سُبُلًا وَأَنْزَلَ مِنَ السَّمَاءِ
مَاءً فَأَخْرَجْنَا بِهِ أَزْوَاجًا مِّن نَّبَاتٍ شَتَّى ﴿٥٣﴾

Artinya: “Yang telah menjadikan bagimu bumi sebagai hamparan dan yang telah menjadikan bagimu di bumi itu jalan-jalan, dan menurunkan dari langit air hujan. Maka **Kami** tumbuhkan dengan air hujan itu berjenis-jenis dari tumbuh-tumbuhan yang bermacam-macam” (Q.S. Thaha (20): 53).

Berdasarkan tafsir Shihab (2002), makna dari “berjenis-jenis dari tumbuh-tumbuhan yang bermacam-macam” adalah tumbuhan diciptakan dalam berbagai macam bentuk dan rupa yang berbeda-beda. Ada yang serupa bentuk buahnya, tetapi berbeda rasa, aroma serta manfaatnya. Adanya perbedaan dari setiap tumbuhan mendorong perkembangan ilmu tumbuh-tumbuhan (Botani) yang sampai saat ini mengandalkan metode pengamatan bentuk luar seluruh organnya dalam semua fase perkembangannya (taksonomi), sehingga dapat diketahui karakter khusus dari masing-masing tumbuhan meski memiliki kemiripan tinggi. Salah satu tumbuhan yang memiliki karakter khusus dengan manfaat yang berbeda dengan tumbuhan lain adalah alpukat (*Persea americana* Mill).

Menurut Chandra (2013) klasifikasi tanaman alpukat (*Persea americana* Mill.) adalah sebagai berikut:

Divisi: Magnoliophyta

Kelas: Magnoliopsida

Subkelas: Magnoliidae

Bangsa: Laurales

Famili: Lauraceae

Genus: *Persea*

Spesies: *Persea americana* Mill.

Persea berasal dari bahasa Yunani yang artinya suatu pohon yang manis buahnya (Lim, 2012). Alpukat (*P. americana*) dalam perkembangannya dan penyebarannya memiliki beberapa nama lain yang berbeda di setiap daerah yaitu sebagai berikut (Trubus, 2013):

Nama daerah : alpuket atau alpukat (Jawa Barat), apokat (Jawa Timur & Jawa Tengah, buah pokat/jamboo pokat (Batak), advokat/pookat (Lampung), dan apuket/wolanda (Sunda).

Nama asing : *avocado* (Inggris), *advocaat* (Belanda), *ahuaca*; *aguacate*; *pagua* (Spanyol), *avokat*; *avocatier*; *avocet* (Perancis), *abakate*; *agnacatebaum*; *avocadobirne* (Jerman), *huangyou guo* (Cina), *awokado* (Thailand), *bo*; *le dau* (Vietnam), *avocado*; *apukado* (Malaysia).

Sinonim : *Persea gratissima* Gaerth

2.1.2 Karakteristik dan Morfologi Alpukat (*Persea americana* Mill.)

Tanaman alpukat (*P. americana*) merupakan tanaman yang berasal dari Meksiko dan Amerika Tengah dan memiliki banyak varietas yang tersebar di seluruh dunia. Tanaman ini kemudian menyebar ke daerah yang beriklim tropik. Tanaman alpukat masuk ke Indonesia pada zaman kerajaan Hindu dan ketika Islam masuk ke Indonesia. Pada mulanya pengembangan tanaman alpukat terkonsentrasi di Pulau Jawa, tetapi saat ini telah menyebar hampir di setiap provinsi di Indonesia. Berdasarkan data penyuluhan pertanian tanaman pangan, daerah sentra produksi alpukat adalah provinsi Jawa Barat dan sekarang mulai menyebar ke segala provinsi (Rukmana, 1997).

Alpukat secara umum terbagi atas tiga tipe yaitu: tipe *West Indian*, tipe *Guatemalan*, dan tipe *Mexican*. Alpukat memiliki bentuk kanopi rimbun dengan tinggi tanaman dapat mencapai 20 meter (Hermanto, 2013). Daging buah alpukat berwarna hijau di bagian bawah kulit dan menguning kearah biji. Warna kulit buah alpukat bervariasi, bisa berwarna hijau ataupun hitam. Warna hijau karena adanya kandungan pigmen klorofil dan warna hitam karena adanya pigmen antosianin (Chandra, 2013).

Alpukat (*P. americana*) merupakan salah satu dari 150 varietas pear. Tumbuhan ini dapat tumbuh di daerah tropis dan subtropis dengan ketinggian 60-80 kaki. Kulit buahnya berwarna hijau kehitaman berbentuk seperti telur yang menonjol pada bagian bawahnya. Bijinya besar dan berukuran 5-6 cm (Ilozue, 2014). Alpukat termasuk tanaman hutan yang tingginya mencapai 20 m. Alpukat berdaun tunggal dengan bentuk panjang (lonjong) sampai bundar telur

memanjang dan tersusun seperti pilin. Pohonnya berkayu dan umumnya memiliki percabangan jarang dan arahnya horizontal. Bunga alpukat keluar pada ujung cabang atau ranting dalam tangkai panjang. Bunga alpukat berwarna putih dan setiap bunga akan mekar sebanyak dua kali (Chandra, 2013).

Alpukat (*P. americana*) tumbuh baik di dataran rendah hingga dataran tinggi pada elevasi 200-1000 m di atas permukaan laut dan memiliki daya tahan terhadap suhu udara 15-30°C atau lebih. Untuk dapat tumbuh optimal, alpukat memerlukan cahaya matahari 40-80% dan suhu optimal 12,8-28,3 °C. Curah hujan minimum yang diperlukan untuk pertumbuhannya berkisar antara 750-1000 mm/tahun. Di daerah dengan curah hujan kurang dari kebutuhan minimal (2-6 bulan kering), tanaman masih dapat tumbuh jika kedalaman air tanah maksimal adalah 2 m (Hermanto, 2013).

Ahli botani menyebutkan bahwa buah alpukat terdiri dari satu karp dan sebuah biji. Biji alpukat diselimuti oleh sebuah jaringan bernama pericarp. Pericarp terdiri dari bagian kulit yang disebut eksokarp, bagian daging buah yang dapat dimakan yaitu mesokarp dan lapisan tipis dekat dengan biji disebut endokarp. Bagian mesokarp sebagian besar terdiri dari sel-sel parenkim isodiametrik yang seragam, dengan ukuran diameter sekitar 60 µm. Seluruh jaringan ini adalah sel-sel minyak atau idioblast dibedakan oleh ukurannya yang besar dan berdingin lignin (Chandra, 2013).



(a) (b) (c) (d)
 Gambar 2.1. Tanaman Alpukat (*P. americana*) Bagian Batang (a), Daun (b),
 Buah (c) dan biji (d)

Sumber: Dokumentasi Pribadi, 2017.

2.1.3 Varietas Alpukat (*Persea americana* Mill.)

Alpukat (*P. americana*) terdiri dari berbagai jenis, berdasarkan sifat ekologisnya terdiri dari 3 jenis keturunan/ras, yaitu ras Meksiko, ras Guatemala, dan ras Hindia Barat (Chandra, 2013). Varietas-varietas alpukat (*P. americana*) di Indonesia dapat digolongkan menjadi dua yaitu varietas unggul dan varietas lain (Lianti, 2014).

1) Varietas Unggul

Sifat-sifat unggul tersebut antara lain produksinya tinggi, toleran terhadap hama dan penyakit, buah seragam berbentuk oval dan berukuran sedang, daging buah berkualitas baik dan tidak berserat, berbiji kecil melekat pada rongga biji, serta kulit buahnya licin. Sampai dengan tanggal 14 Januari 1987, Menteri Pertanian telah menetapkan 2 varietas alpukat unggul, yaitu alpukat hijau panjang dan hijau bundar. Karakteristik alpukat hijau panjang dan hijau bundar dapat dilihat pada Tabel di bawah ini (Lianti, 2014):

Karakteristik	Alpukat (<i>Persea americana</i> Var. Hijau Panjang)	Alpukat (<i>Persea americana</i> Var. Hijau Bundar)
Tinggi Pohon	5-8 meter	6-8 meter
Bentuk Daun	Bulat panjang dengan tepi rata	Bulat panjang dengan tepi berombang
Masa Berbuah	Terus-menerus, tergantung lokasi dan kesuburan lahan	Terus-menerus, tergantung lokasi dan kesuburan lahan
Berat Buah	0,3-0,5 kg	0,3-0,4 kg
Bentuk Buah	Pear (<i>pyrifoam</i>)	Lonjong (oblong)
Rasa Buah	Enak, gurih, agak lunak	Enak, gurih, agak kering
Diameter Buah	6,5-10 cm (rata-rata 14 cm)	7,5 cm
Panjang Buah	11,5-18 cm (ratarata 14 cm)	9 cm
Hasil	40-80 kg/pohon/tahun (rata-rata 50 kg)	20-60 kg/pohon/tahun (rata-rata 30 kg)

Tabel 2.1. Karakteristik Alpukat Hijau Panjang dan Hijau Bundar

Sumber: Lianti, (2014).

2) Varietas Lain

Varietas alpukat kelompok ini merupakan plasma nutfah Instalasi Penelitian dan Pengkajian Teknologi, Tlekung, Malang, seperti alpukat merah panjang, merah bundar, *dickson*, *butler*, *winslowson*, *benik*, *puebla*, *furete*, *collinson*, *waldin*, *ganter*, *mexcola*, *duke*, *ryan*, *leucadia*, *queen* dan *edranol* (Lianti, 2014).

2.1.4 Biji Alpukat (*Persea americana* Mill.)

Biji alpukat (*P. americana*) tergolong jenis biji yang berukuran besar, terdiri dari dua keping (*cotyledon*), dan dilapisi oleh kulit biji yang tipis melekat. Biji tersusun oleh jaringan *parenchyma* yang mengandung sel-sel minyak dan butir tepung sebagai bahan cadangan makanan dan biji alpukat memiliki selaput pelindung biji berwarna kekuning-kuningan (Sunarjono, 2000 dalam Chandra, 2013). Biji alpukat (*P. americana*) terdiri dari 65% daging buah (mesokarp), 20% biji (endokarp), dan 15% kulit buah (perikarp) (Prasetyowati, 2010). Ukuran biji alpukat (*P. americana*) sekitar 5-6 cm (Ilozue dkk, 2014), bentuk bulat hingga

lonjong dan beratnya bisa mencapai 2,3 kg dengan diameter 2,5-5 cm dan keping bijinya berwarna putih kemerahan (Napitupulu, 2008).

Biji alpukat memiliki efek hipoglikemik dan dapat digunakan untuk pengobatan secara tradisional dengan cara dikeringkan kemudian dihaluskan, dan air seduhannya dapat diminum. Biji alpukat dipercaya dapat mengobati sakit gigi, maag kronis, hipertensi dan diabetes mellitus. Beberapa penelitian yang telah dilakukan menunjukkan bahwa biji alpukat memiliki kandungan berbagai senyawa berkhasiat, salah satunya adalah efek antidiabetes melalui kemampuannya menurunkan kadar glukosa darah (Zuhrotun, 2007). Hasil skrining fitokimia yang dilakukan oleh Zuhrotun (2007) terhadap simplisia dan ekstrak etanol biji alpukat menunjukkan bahwa biji alpukat mengandung polifenol, flavanoid, triterpenoid, kuinon, saponin, tannin dan monoterpenoid dan seskuiterpenoid.

2.1.5 Manfaat Biji Alpukat (*Persea americana* Mill.)

Tumbuhan yang ada di muka bumi ini mempunyai manfaat tersendiri dalam memenuhi kemaslahatan hidup manusia salah satunya adalah Biji alpukat (*P. americana*) yang mengandung beberapa jenis senyawa aktif dengan berbagai khasiat. Pengetahuan mengenai manfaat suatu tumbuhan tentu bermula dengan adanya suatu penelitian dan kemudian mengkajinya. Allah SWT telah memberikan anugerahnya kepada manusia dengan menciptakan berbagai kekayaan alam yang dapat dimanfaatkan. Manusia dianjurkan untuk menggunakan akalinya untuk berfikir dan mengkaji segala sesuatu yang ada di langit dan bumi, karena tidak ada

satupun ciptaan Allah SWT yang sia-sia. Sebagaimana tersirat dalam surat Ali Imran (3) ayat 190 yang berbunyi:

إِنَّ فِي خَلْقِ السَّمَوَاتِ وَالْأَرْضِ وَأَخْتِلَافِ اللَّيْلِ وَالنَّهَارِ لَآيَاتٍ لِأُولِي الْأَلْبَابِ ﴿١٩٠﴾

Artinya: “*Sesungguhnya, dalam penciptaan langit dan bumi, dan pergantian malam dan siang, terdapat tanda-tanda (kebesaran Allah) bagi orang yang berakal*” (Q.S. Ali-‘Imran (3): 190).

Shihab (2002) mengungkapkan bahwa terdapat perintah Allah SWT kepada manusia yang telah diberi kenikmatan berupa akal dan pikiran untuk meneliti dan mengkaji segala sesuatu yang ada di langit dan bumi, karena tidak hasil ciptaan Allah SWT yang sia-sia. Allah menciptakan manusia dan memuliakannya sebagai makhluk yang paling istimewa. Oleh karena itu, dengan akal dan pikirannya manusia diharapkan mampu mengkaji ciptaan Allah salah satunya yaitu tumbuhan dengan berbagai manfaatnya.

Firman Allah mengenai tumbuhan beserta manfaatnya secara tersirat juga telah dijelaskan dalam Al-Qur’an surat Al-An’am (6) ayat 95 sebagai berikut:

إِنَّ اللَّهَ فَالِقُ الْحَبِّ وَالنَّوَى ۗ يُخْرِجُ الْحَيَّ مِنَ الْمَيِّتِ وَمُخْرِجُ الْمَيِّتِ مِنَ الْحَيِّ ۗ ذَٰلِكُمْ اللَّهُ فَالِقُ الْحَبِّ وَالنَّوَى ۗ فَآلَىٰ تُؤَفَّكُونَ ﴿٩٥﴾

Artinya: “*Sesungguhnya Allah menumbuhkan butir tumbuh-tumbuhan dan biji buah-buahan. Dia mengeluarkan yang hidup dari yang mati dan mengeluarkan yang mati dari yang hidup. (yang memiliki sifat-sifat demikian ialah Allah, Maka mengapa kamu masih berpaling?)*” (Q.S. Al-An’am (6): 95).

Ayat di atas secara tersirat telah menjelaskan bahwa Allah SWT menciptakan tumbuhan dengan beberapa bagian seperti butir-butir, biji, serta buahnya. Sebagaimana yang ada dalam *Tafsir Ibnu Katsir* bahwa sesungguhnya

Allah menumbuhkan tumbuh-tumbuhan berasal dari biji yang merupakan benda mati yang berasal dari tumbuhan sebagai makhluk hidup (Ghoffar, 2007). Ayat tersebut juga menunjukkan kekuasaan dan keagungan Allah bahwa dari benda mati diciptakan makhluk hidup yang bermanfaat bagi makhluk hidup lainnya seperti halnya tumbuhan. Sedangkan makna dari mengeluarkan yang mati dari yang hidup menunjukkan bahwa terdapat kandungan senyawa aktif dalam tumbuhan sebagai makhluk hidup yang memiliki khasiat dan bermanfaat bagi makhluk hidup lain.

Tumbuhan yang dapat dimanfaatkan sebagai obat alami karena memiliki berbagai khasiat baik yang berasal dari bagian daun, buah maupun bijinya salah satunya adalah alpukat (*Persea americana* Mill.). Arukwe dkk, (2012) menjelaskan bahwa buah alpukat (*P. americana*) merupakan tumbuhan yang bermanfaat dalam bidang kesehatan karena memiliki kandungan kimia yang penting dalam daun, buah dan bijinya. Alpukat (*P. americana*) merupakan tanaman yang berasal dari dataran tinggi Amerika Tengah. Tumbuhan ini mampu tumbuh di daerah tropis maupun subtropis dengan ketinggian 60-80 kaki serta memiliki banyak varietas yang tersebar di seluruh dunia serta dapat (Ilozue dkk, 2014).

Tumbuhan itu sendiri memiliki manfaat dalam berbagai hal khususnya untuk memenuhi kebutuhan manusia, baik sebagai sumber makanan, sandang, papan, dan sebagai sumber pengobatan alami. Allah SWT berfirman dalam Surat Asy-Syu'araa (26): 7-8 sebagai berikut:

أَوَلَمْ يَرَوْا إِلَى الْأَرْضِ كَيْفَ أَنْبَتْنَا فِيهَا مِنْ كُلِّ زَوْجٍ كَرِيمٍ ﴿٧﴾

إِنَّ فِي ذَٰلِكَ لَآيَةً وَمَا كَانَ أَكْثَرُهُمْ مُّؤْمِنِينَ ﴿٨﴾

Artinya: “Dan Apakah mereka tidak memperhatikan bumi, berapakah banyaknya Kami tumbuhkan di bumi itu **berbagai macam tumbuh- tumbuhan yang baik**? Sesungguhnya pada yang demikian itu benar-benar terdapat suatu tanda kekuasaan Allah. Dan kebanyakan mereka tidak beriman.” (Q.S. Asy-Syu’araa (26): 7-8).

Ayat tersebut menjelaskan bahwa Allah SWT menciptakan berbagai macam tumbuhan yang baik yang tidak lain merupakan suatu bentuk keagungan dan kekuasaan-Nya. Dalam ayat di atas terdapat lafadz **يَكْرِيم** yang memiliki arti baik dan mulia, Shihab (2002) juga menjelaskan bahwa lafadz **يَكْرِيم** dapat digunakan untuk menggambarkan segala sesuatu yang baik bagi setiap objek yang disifatinya. Tumbuhan yang baik, paling tidak adalah yang tumbuh subur dan bermanfaat.

Tumbuhan memang telah sejak lama dimanfaatkan sebagai sumber alami untuk menjaga kesehatan masyarakat serta mengobati berbagai jenis penyakit, terutama di negara berkembang. Menurut WHO, sekitar 80% penduduk berkembang menggunakan pengobatan tradisional yang bersumber dari bahan alami karena selain dinilai aman dan murah, obat tradisional juga diduga mampu menimbulkan efek sinergis yang menguntungkan (Dalter, 2003). Penggunaan bahan alami yang berasal dari tumbuhan sebagai obat tradisional juga merupakan sarana mengambil pelajaran, pemahaman dan memikirkan tentang kekuasaan Allah SWT serta meneladani pengobatan ala Rosululloh SAW. Aiman (2005) menjelaskan bahwa Rosululloh SAW telah memberikan petunjuk cara mengobati diri beliau dengan menggunakan obat alami yang tidak mengandung campuran bahan kimia. Pengobatan ala Rosululloh SAW menggunakan 3 jenis obat yaitu

obat alamiah, illahiyah dan kombinasi antara keduanya. Obat alamiah tersebut dapat diperoleh dari tumbuh-tumbuhan yang baik sebagaimana telah dijelaskan pada ayat di atas.

Biji alpukat (*P. americana*) diketahui memiliki efek hipoglikemik dan dapat digunakan sebagai obat tradisional untuk mengobati sakit gigi, maag kronis, hipertensi dan diabetes melitus (Monica, 2006). Hasil penapisan fitokimia ekstrak biji alpukat menunjukkan bahwa biji alpukat mengandung polifenol, flavonoid, triterpenoid, kuinon, saponin, tanin dan monoterpenoid dan seskuiterpenoid Zuhrotun (2007).

Biji alpukat (*P. Americana*) memiliki kandungan serat tinggi yang dapat menurunkan resiko penyakit kardiovaskuler, kanker, hipertensi begitupula dengan obesitas. Bijinya dipercaya sebagai obat, pencegahan diarrhoea, disentri, sakit gigi, bisul, penurunan kolesterol dan kecantikan kulit. Biji alpukat kaya akan tanin dan karotenoid secara *in vitro* menunjukkan penghambatan kanker kelenjar prostat (Ilozue, 2014).

2.1.6 Kandungan Fitokimia Biji Alpukat (*Persea americana* Mill.)

Alpukat (*P. americana*) merupakan salah satu buah yang tumbuh pada iklim tropis dan kaya akan senyawa fitokimia yang aktif secara biologis (Malangngi dkk, 2012). Biji alpukat dilaporkan mengandung 12,67% air, 2,78% abu dan 0,54% mineral serta mengandung campuran komponen polifenolik seperti halnya katekin dan epikatin (Alsuhendra dkk, 2007). Selain itu, biji alpukat (*Persea americana* Mill.) juga mengandung beberapa jenis senyawa diantaranya adalah sebagai berikut: saponin, tanin, flavonoid, alkaloid, dan fenol. Adapun

jumlah pada masing-masing bagian seperti daun, buah dan biji berbeda, berikut ada perinciannya (Arukwe dkk, 2012):

Senyawa Aktif	Daun	Buah	Biji
Saponin	1,29 ± 0,08	0,14 ± 0,01	19,21 ± 2,81
Tannin	0,68 ± 0,06	0,12 ± 0,03	0,24 ± 0,12
Flavonoid	8,11 ± 0,14	4,25 ± 0,16	1,90 ± 0,07
Alkaloid	0,51 ± 0,21	0,14 ± 0,00	0,72 ± 0,12
Fenol	3,41 ± 0,64	2,94 ± 0,13	6,14 ± 1,28
Steroid	1,21 ± 0,14	1,88 ± 0,19	0,09 ± 0,00
Glikosida sianogen	ND	ND	0,06 ± 0,02

Tabel 2.2. Senyawa fitokimia dari daun, buah, dan biji alpukat (mg/100 g)

Sumber: Arukwe dkk., (2012)

Menurut Nwaoguikpe (2011) ekstrak air biji alpukat (*P. americana*) mengandung sejumlah senyawa aktif seperti saponin (51,00±0,0) sebagai senyawa terbanyak, tanin (21,66±0,0) dengan urutan kedua, flavonoid (21,00±0,0), alkaloid (9,43±0,2) dan glikosida sianogenik (4,86±0,0). Idris dkk, (2009) menambahkan bahwa dalam biji alpukat (*P. americana*) terdapat kandungan terpenoid dan *cardiac glycoside* pada pelarut polar. Sedangkan kandungan fitokimia ekstrak biji alpukat dengan menggunakan beberapa jenis pelarut ada beberapa jenis kandungan fitokimia yang dapat diserap, berikut adalah perinciannya (Parameswaran, 2014):

No	Kandungan fitokimia	Ekstrak					
		Air	Etanol	Etil asetat	Klorofom	Eter	Metanol
1	Fenol	+++	+++	++	++	+	++
2	Terpenoid	+++	+++	++	++	+	++
3	Tanin	-	+	+	-	-	++
4	Saponin	-	+++	+	++	+++	++
5	Flavonoid	+	+++	++	++	+	+
6	Steroid	++	+++	++	+	+	+
7	Alkaloid	+	-	++	-	+	++
8	Karbohidrat	++	-	+++	++	-	+
9	Protein/	++	++	+	+	+	+

	Asam Amino						
10	Kuinon	+++	++	++	++	+++	++
11	Kumarin	-	+++	-	+	+	-

Tabel 2.3. Kandungan Fitokimia Ekstrak Biji Alpukat dengan Berbagai Pelarut
Keterangan: +++ = sangat banyak; ++ = banyak; + = sedikit; - = tidak ada
Sumber: Parameswaran, (2014).

2.1.7 Manfaat Biji Alpukat (*Persea amrecana* Mill.) sebagai Antibakteri

Biji alpukat (*P. Americana*) memiliki manfaat sebagai antimikroba karena memiliki kandungan flavonoid (Cowan 2002 dalam Idris dkk, 2009). Hal ini ditunjukkan oleh hasil penelitian yang dilakukan oleh Idris dkk, (2009) bahwa ekstrak biji alpukat (*P. americana*) dengan beberapa jenis pelarut diantaranya etil asetat, petroleum eter, metanol dan klorofom dapat menghambat pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Corynebacterium ulcerans*, *Bacillus subtilis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Neisseria gonorrhoea*, dan *Candida albicans*. Adapapun detail besar zona hambat yang menunjukkan aktivitas antimikroba untuk masing-masing pelarut terhadap beberapa jenis mikroba dapat dilihat pada berikut (Idris dkk, 2009):

Organisme Uji	Zona Hambat (mm)				Streptomisin (30 µg/dics)
	PE	CF	EA	ME	
<i>S. aureus</i>	16	32	37	37	27
<i>S. pyogenes</i>	15	32	35	35	22
<i>C. albicans</i>	9	37	40	42	-
<i>N. gonorrhoea</i>	17	34	33	27	-
<i>P. aeruginosa</i>	16	28	22	32	-
<i>K. pneumoniae</i>	22	24	27	22	20
<i>E. coli</i>	6	0	16	0	0
<i>S. typhi</i>	8	0	16	0	0
<i>B. subtilis</i>	27	31	32	31	30
<i>C. ulcerans</i>	7	12	20	15	-

Tabel 2.4 Penentuan Aktivitas Antimikroba Ekstrak Biji Alpukat *P. americana*
Keterangan: PE=Petroleum Eter, CF=Chlorofom, EA=Etil Asetat, ME=Metanol
Sumber: Idris dkk, (2009).

Diantara kandungan metabolit sekunder pada biji alpukat yang berpotensi sebagai antibakteri adalah sebagai berikut:

1) Alkaloid

Alkaloid yang terkandung dalam biji alpukat (*P. americana*) dapat digunakan sebagai obat analgesik dan efek bakterisidal (Arukwe dkk, 2012). Alkaloid juga memiliki khasiat dalam pengobatan malaria, diabetes, hipertensi (Ilozue dkk, 2014). Alkaloid merupakan senyawa nitrogen heterosiklik, diketahui memiliki aktivitas antimikroba. Senyawa alkaloid dapat menghambat aktivitas bakteri gram positif dan negatif secara *in vivo*, namun mekanismenya masih belum jelas (Novalina dkk, 2013). Menurut Cowan (1999), alkaloid memiliki aktivitas antibakteri dengan cara interkelasi ke dinding sel dan DNA pada bakteri.

Menurut Wink dkk (1998), senyawa-senyawa golongan alkaloid dapat menghambat DNA polimerase dan juga mampu menghambat biosintesis protein pada proses translasi. Robinson (1995) menyatakan bahwa alkaloid dapat mengganggu terbentuknya komponen penyusun peptidoglikan pada sel bakteri, sehingga lapisan dinding sel tidak terbentuk secara utuh dan menyebabkan kematian pada bakteri.

2) Flavonoid

Flavonoid yang terkandung dalam biji alpukat (*P. americana*) berkhasiat sebagai antioksidan, oksidasi kerusakan sel, antikanker, antikarsinogenik (Arukwe dkk, 2012). Flavonoid menyebabkan terjadinya kerusakan permeabilitas dinding sel bakteri, mikrosom, dan lisosom sebagai hasil interaksi antara flavonoid dengan DNA bakteri (Sabir, 2005 *dalam* Dewi, 2013). Flavonoid juga

berkhasiat sebagai antibakteri dengan cara membentuk kompleks dengan protein ekstraseluler yang terdapat pada dinding sel bakteri, dimungkinkan hal tersebut menyebabkan rigiditas dari dinding sel mengalami penurunan, sehingga mengakibatkan flavonoid mampu menerobos dinding sel. Selain itu, flavonoid yang bersifat lipofilik dapat menerobos membran sel bakteri, mengurangi fluiditas dari membran sel, kemudian mendenaturasi protein yang menyebabkan aktivitas metabolisme bakteri terhenti (Novalina dkk., 2013).

3) Saponin

Setiap sel bakteri dikelilingi membran sitoplasma yang tersusun dominan oleh ergosterol yang bersifat permeabel selektif. Selain itu, fosfolipid juga merupakan senyawa yang penting dalam pembentukan membran sitoplasma bakteri. Mekanisme kerusakan membran sitoplasma oleh senyawa saponin (polifenol) dilakukan dengan cara melepaskan ion H^+ yang selanjutnya menyerang gugus hidrofilik (gugus hidroksi dan fosfat) pada permukaan membran sel, mengakibatkan gugus hidroksi pada molekul ergosterol berikatan dengan hidrogen terputus, sehingga membran sel tidak mampu menahan tekanan dari dalam, akibatnya sitoplasma dalam sel akan menembus keluar (Dewi, 2013).

Molekul fosfolipid ion H^+ dari senyawa saponin akan menyerang gugus polar (gugus fosfat) sehingga molekul fosfolipid akan terurai menjadi gliserol, asam karboksilat, dan asam fosfat. Hal ini mengakibatkan fosfolipid tidak mampu mempertahankan bentuk membran sitoplasma akibatnya membran sitoplasma akan bocor sehingga zat-zat untuk metabolisme sel bakteri akan terbuang keluar dan bakteri akan mati (Dewi, 2013).

4) Fenol

Senyawa fenolik merupakan senyawa yang penting karena merupakan kelas besar di antara senyawa-senyawa penyusun tumbuhan. Mekanisme antimikroba senyawa fenolik secara *in vivo* adalah dengan mengganggu kerja membran sitoplasma bakteri, termasuk di antaranya mengganggu transpor aktif dan kekuatan proton (Harborne, 1987).

Senyawa fenolik berperan menurunkan tegangan permukaan sel mikroba, gugus OH dari fenol dapat bersifat racun bagi protoplasma sel, dapat menembus dan merusak dinding sel serta mendenaturasi protein enzim dalam sitoplasma dengan membentuk ikatan hidrogen pada sisi aktif enzim (Prindle, 1983). Mekanisme antibakteri pada fenolik yaitu penghambatan enzim oleh senyawa teroksidasi, melalui reaksi dengan sulfhidril atau melalui interaksi nonspesifik dengan protein (Cowan, 1999). Senyawa fenol yang terkandung dalam biji alpukat (*P. americana*) juga memiliki kemampuan sebagai antiinflamasi, antikoagulan, antioksidan, serta peningkat sistem imun (Arukwe dkk, 2012).

5) Tanin

Tanin yang terkandung dalam biji alpukat (*P. americana*) berkasiat dalam proses menyembuhkan luka dan inflamasi (Arukwe dkk, 2012). Tanin juga berkasiat sebagai obat diare, inflamasi pada mulut, kerongkongan dan kulit yang terluka (Ilozue dkk, 2014). Tanin diduga dapat mengerutkan dinding sel atau membran sel sehingga mengganggu permeabilitas sel (Ajizah, 2004). Tanin mampu menghambat pertumbuhan bakteri dengan cara mengkoagulasi protoplasma bakteri. Mekanisme penghambatan tannin dengan cara dinding

bakteri yang telah lisis akibat senyawa saponin dan flavonoid, sehingga menyebabkan senyawa tannin dapat dengan mudah masuk ke dalam sel bakteri dan mengkoagulasi protoplasma sel (Pratiwi, 2008 dalam Karlina, 2013).

2.1.8 Manfaat Biji Alpukat (*Persea amrecana* Mill.) sebagai Imunomodulator

Diantara kandungan metabolit sekunder pada biji alpukat, satu diantaranya yang berpotensi sebagai imunomodulator adalah saponin. Saponin yang terkandung dalam biji alpukat (*P. americana*) berkhasiat dalam meningkatkan sistem kekebalan tubuh, memperbaiki tingkat gula darah, menguatkan fungsi hati dan memperlambat proses pembekuan darah (Rasyad (2012). Menurut Ilozue dkk (2014), saponin juga berkhasiat sebagai obat antiinflamasi, antikarsinogenik, dan antilipidemik.

Saponin merupakan senyawa aktif yang memiliki kemampuan dalam meningkatkan respon imunitas tubuh yang terinfeksi bakteri karena berfungsi sebagai imunomodulator alami terutama untuk meningkatkan jumlah sel-sel imunokompeten seperti sel makrofag, sel-T dan sel-B (Faizah, 2014). Saponin juga memiliki kemampuan untuk menginduksi produksi sitokin seperti interleukin (IL) dan interferons (IFN) yang berperan dalam efek imunostimulan (Mahima dkk, 2013).

Interleukin (IL) dan interferon (IFN) akan bereaksi dengan antigen (benda-benda asing termasuk bakteri) yang masuk ke dalam tubuh (Tizard, 1998 dalam Kurnianingtyas, 2013). Interleukin (IL) dapat merangsang produksi IFN- γ oleh sel *Natural Killer* (NK) dan sel-T CD4, sementara IFN- γ dapat memicu pelepasan proliferasi limfosit yang akan mengaktifasi makrofag sehingga adanya bakteri

yang masuk menyebabkan peningkatan aktivitas dan kapasitas fagositosis oleh bantuan enzim lisozim dan elastase yang menyebabkan bakteri lisis (Susilo, tanpa tahun)

Saponin dalam jumlah normal berperan sebagai immunostimulator, sedangkan dalam jumlah yang melebihi batas normal saponin akan berperan sebagai immunosupresor (zat yang menekan atau menurunkan sistem imun) (Francis, 2001 dalam Kurnianingtyas, 2013). Selama stimulasi antigen skunder secara *in vitro*, saponin dapat menstimulasi sel-sel yang ada pada nodus limfa seperti sel T yang telah berikatan dengan antigen untuk menyekresikan sitokin, satu di antaranya adalah IL-10 (Tadokoro, 1996).

2.2 Ekstraksi

2.2.1 Pengertian Ekstraksi

Ekstraksi adalah proses pemisahan satu atau lebih komponen dari suatu campuran homogen menggunakan pelarut cair (*solvent*) sebagai *separating agent*. Dengan kata lain dalam proses ekstraksi terjadi pemisahan fisika berdasarkan prinsip beda konsentrasi dan beda kelarutan (Risya dkk, 2016). Menurut Tiwari dkk (2011), ekstraksi juga dapat didefinisikan sebagai proses pemisahan bahan aktif dalam sel atau jaringan tanaman yang bersifat inaktif atau inert dengan menggunakan pelarut yang sesuai dengan polaritasnya.

Tujuan utama dari ekstraksi adalah untuk mendapatkan atau memisahkan sebanyak mungkin zat-zat yang memiliki khasiat pengobatan. Zat aktif yang terdapat dalam simplisia tersebut dapat digolongkan ke dalam golongan minyak atsiri, alkaloid, flavonoid dan lain-lain (Depkes RI, 2000). Hasil ekstraksi disebut

ekstrak, yaitu sediaan kental atau cair yang diperoleh dengan cara mengekstraksi zat aktif dengan pelarut yang sesuai kemudian menguapkan semua atau hampir semua pelarut yang digunakan pada ekstraksi (Depkes RI, 1995).

Adapun parameter kualitas dari ekstraksi tergantung oleh berbagai hal seperti jenis bahan yang digunakan, jenis pelarut, dan prosedur ekstraksi. Hasil bahan aktif yang diekstraksi dipengaruhi oleh beberapa faktor yakni ukuran bahan, tipe ekstraksi, waktu ekstraksi, temperatur, jenis pelarut, pH, konsentrasi pelarut, dan polaritas. Pengecilan ukuran suatu bahan yang akan diekstraksi bertujuan untuk memperluas bidang permukaan bahan sehingga akan mempercepat penetrasi pelarut ke dalam bahan yang akan diekstrak dan mempercepat waktu ekstraksi. Namun ukuran bahan yang terlalu kecil juga menyebabkan banyak minyak volatile yang menguap selama penghancuran (Tiwari dkk, 2011).

Berdasarkan bentuk campuran yang diekstraksi, dapat dibedakan dua macam ekstraksi yaitu (Kristanti dkk, 2008):

- a) Ekstraksi padat cair, jika substansi yang diekstraksi terdapat di dalam campurannya yang berbentuk padat. Proses ini paling banyak ditemui di dalam usaha untuk mengisolasi suatu substansi yang terkandung di dalam suatu bahan alam.
- b) Ekstraksi cair-cair, jika substansi yang diekstraksi terdapat di dalam campurannya yang berbentuk cair.

2.2.2 Pelarut untuk Ekstraksi

Pelarut merupakan salah satu faktor yang menentukan dalam proses ekstraksi, sehingga banyak faktor yang harus diperhatikan dalam pemilihan pelarut (Pelczar, 2008). Terdapat dua pertimbangan utama dalam memilih jenis pelarut, yaitu pelarut yang harus mempunyai daya larut yang tinggi dan pelarut tidak berbahaya atau tidak beracun. Pelarut yang digunakan dalam ekstraksi harus dapat melarutkan ekstrak yang diinginkan saja, mempunyai kelarutan yang besar, tidak menyebabkan perubahan secara kimia pada komponen ekstrak, dan titik didih kedua bahan tidak boleh terlalu dekat. Ekstraksi dengan pelarut tertentu didasarkan pada sifat kepolarannya zat dalam pelarut saat ekstraksi. Senyawa polar hanya akan larut pada pelarut polar, seperti etanol, methanol, butanol, dan air. Sedangkan senyawa non-polar juga hanya akan larut pada pelarut non-polar, seperti heksana dan petroleum eter (Dwidjoseputro, 1994).

Pemilihan pelarut untuk proses ekstraksi dengan tujuan mengambil bahan aktif tertentu dapat menentukan jenis senyawa aktif yang dapat diperoleh. Salah satu jenis pelarut yang sesuai untuk membuat ekstrak biji alpukat (*P. americana*) adalah dari jenis etanol (tabel 4). Etanol atau alkohol (C_2H_5OH) merupakan cairan tidak berwarna yang larut dalam air, densitas 0,6 ($0^\circ C$) titik leleh $-169^\circ C$, titik didih $-102^\circ C$. Memiliki gugus hidroksil (OH) pada alkohol yang menyebabkan bersifat polar, sedangkan gugus alkil (R) merupakan gugus non polar. Proporsi dari kedua gugus tersebut merupakan faktor yang menentukan sifat alkohol (Daintith, 1994). Etanol memiliki tetapan dielektrik pada suhu $200^\circ C$ sebesar 20,7 (Stahl, 1985).

2.2.3 Maserasi

Maserasi merupakan metode yang paling umum digunakan untuk ekstraksi karena mudah dilakukan dan menggunakan alat yang sederhana. Namun, teknik maserasi kurang efisien karena membutuhkan waktu cukup lama dalam pengerjaannya dan hanya dilakukan perendaman. Pada maserasi hanya dilakukan perendaman sehingga osmosis pelarut ke dalam padatan berlangsung statis meskipun telah dilakukan pergantian pelarut dengan metode remaserasi (Nurasiah, 2010 *dalam* Nugrahaningtyas, 2005).

Maserasi merupakan cara ekstraksi yang sederhana dilakukan dengan cara merendam serbuk simplisia dalam pelarut. Pelarut akan menembus dinding sel dan masuk ke dalam rongga sel yang mengandung zat aktif sehingga zat aktif akan larut. Karena adanya perbedaan konsentrasi antara larutan zat aktif sehingga zat aktif di dalam sel, maka larutan yang terpekat didesak keluar. Pelarut yang digunakan dapat berupa air, etanol, air-etanol, atau pelarut lain. Keuntungan cara ekstraksi ini adalah cara pengerjaan dan peralatan yang digunakan sederhana dan mudah diusahakan. Kerugiannya adalah waktu pengerjaan lama dan waktu ekstraksi kurang sempurna (Guenther, 1987).

2.3 Bakteri *Staphylococcus aureus*

2.3.1 Karakteristik dan Morfologi

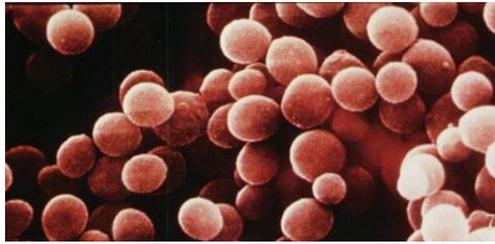
Staphylococcus aureus merupakan patogen utama bagi manusia. Hampir setiap orang akan mengalami beberapa tipe infeksi *S. aureus* sepanjang hidupnya, bervariasi dalam beratnya mulai dari keracunan makanan atau infeksi kulit ringan,

sampai infeksi berat yang mengancam jiwa. *S. aureus* tumbuh dengan optimum pada suhu 37° C (Brooks dkk, 2008).

Staphylococcus aureus merupakan salah satu jenis flora normal dalam tubuh manusia. Flora normal adalah sekumpulan mikroorganisme yang hidup pada kulit dan selaput lendir/mukosa manusia pada kondisi sehat maupun sakit. Pertumbuhan flora normal pada bagian tubuh tertentu dipengaruhi oleh suhu, kelembaban, nutrisi dan adanya zat penghambat. Keberadaan flora normal pada bagian tubuh tertentu mempunyai peranan penting dalam pertahanan tubuh karena menghasilkan suatu zat yang menghambat pertumbuhan mikroorganisme lain (Brooks dkk, 2008).

Adanya flora normal pada bagian tubuh tidak selalu menguntungkan, dalam kondisi tertentu flora normal dapat menimbulkan penyakit, misalnya bila terjadi perubahan substrat atau berpindah dari habitat yang semestinya. Infeksi serius akibat *S. aureus* akan terjadi ketika resistensi inang melemah karena adanya perubahan hormon, adanya penyakit, luka, atau perlakuan menggunakan steroid atau obat lain yang mempengaruhi imunitas sehingga terjadi pelemahan inang (Brooks dkk, 2008).

Staphylococcus aureus merupakan bakteri gram positif yang berbentuk bulat (kokus) dengan diameter 0,7-1,2 µm. Bakteri ini umumnya tumbuh secara berkelompok dan tidak beraturan menyerupai buah anggur, bersifat fakultatif anaerobik, tidak membentuk spora serta non-motil (tidak bergerak). Koloni *S. aureus* pada media padat berwarna abu-abu sampai kuning keemasan, berbentuk bulat, halus, menonjol, dan berkilau (Jawetz dkk, 2007).



Gambar 2.2 Bakteri *S. aureus* (pengamatan menggunakan mikroskop elektron)
(Sumber: Todar, 2008).

2.3.2 Klasifikasi Bakteri *Staphylococcus aureus*

Taksonomi bakteri *Staphylococcus aureus* menurut *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* dalam Putera (2014) adalah sebagai berikut:

Kingdom: Bacteria

Phylum: Firmicutes

Class: Bacilli

Family: Staphylococcaceae

Genus: *Staphylococcus*

Species: *Staphylococcus aureus*

Nama genus "*Staphylococcus*" diberikan oleh Ogston karena pada pengamatan mikroskopis bakteri tersebut memiliki bentuk seperti buah anggur, "coccus" yang berarti "granul sedangkan nama spesies "*aureus*" diberikan oleh Rosenbach karena pada biakan murni koloninya terlihat berwarna kuning keemasan (Radji, 2011).

2.3.3 Patogenitas

Staphylococcus aureus merupakan spesies dari genus *Staphylococcus* yang paling patogen bagi manusia dan dapat menyerang semua sistem organ pada tubuh (Jawetz dkk, 2007). Pada dasarnya bakteri *S. aureus* merupakan satu di

antara beberapa jenis mikro flora normal dalam tubuh. Mikro flora normal tidak bersifat patogen, kecuali *S. aureus*. Bakteri ini dapat menyebabkan penyakit jika telah mencapai jumlah 10^5 CFU/ml, yaitu suatu jumlah yang cukup untuk memproduksi toksin (Karlina, 2013).

Ciri khas infeksi *S. aureus* adalah radang supuratif pada jaringan lokal dan cenderung menjadi abses. Infeksi serius akan terjadi ketika resistensi inang melemah karena adanya perubahan hormon, adanya penyakit, luka, dan penggunaan steroid atau obat lain yang mempengaruhi imunitas sehingga terjadi pelemahan inang (Syahrurrahman, 1993 dalam Afifurrahman 2014).

Infeksi *S. aureus* biasanya menyebabkan terbentuknya suatu kantung berisi nanah, yaitu abses dan bisul. *S. aureus* dapat menyebar melalui pembuluh darah dan menyebabkan abses pada organ seperti paru-paru, tulang (*osteomyelitis*) dan lapisan dalam yang apabila tidak dibersihkan maka akan mengakibatkan infeksi lebih lanjut (Harvey dkk, 2007). *S. aureus* menyerang dan bertahan hidup di dalam sel epitel termasuk sel endotel, sehingga sulit dikenali oleh sistem pertahanan tubuh. *S. aureus* juga mampu membentuk koloni kecil berbeda-beda atau *small-colony variants* (SCVs) yang menyebabkan infeksinya sulit disembuhkan (Glaser dkk, 2008).

Hasil pemeriksaan keberadaan *S. aureus* tergantung pada tempat terjadinya infeksi. Dalam lubang hidung, sel makrofag sebagai *antigen presenting cell* (APC) utama yang akan menyekresikan interleukin-10 (IL-10) dalam jumlah tinggi sesuai dengan stimulus dari *S. aureus* sehingga menyebabkan terjadinya kolonisasi. Infeksi pada bagian kulit oleh *S. aureus*, turunan myeloid penekan sel

(MDSCs) direkrut untuk menekan respon yang diperantarai oleh sel T sehingga menyebabkan terjadinya kolonisasi. Di sisi lain untuk infeksi pada bagian kulit, terdapat sel langerhans sebagai APC utama yang akan mengaktifkan respon Th1 dan Th17 sehingga mengakibatkan pembersihan bakteri. Lain halnya jika bakteri terdapat dalam darah maka yang bertindak sebagai APC utama adalah monosit yang akan menyekresikan IL-10 berlimpah sehingga memfasilitasi penghindaran terhadap sistem kekebalan tubuh dan menyebabkan sepsis (Li dkk, 2013).

2.3.4 Faktor Virulensi *Staphylococcus aureus*

Faktor virulensi merupakan bagian dari sel yang bersifat patogen, dapat berupa zat yang dikeluarkan ke lingkungan. Faktor virulensi *S. aureus* beragam seperti yang terdapat dalam dinding selnya yaitu kapsul, protein A, dan asam teikoat. Faktor virulensi lain yang dihasilkan hampir semua strain *S. aureus* berupa eksoprotein seperti nuklease, protease, lipase, hyaluronidase, dan kolagenase, serta eksotoksin seperti α -hemolisin, β -hemolisin, γ -hemolisin, leukocidin, dan *Panton-Valentine Leukocidin* (PVL) (Bien dkk, 2011).

1. Dinding Sel

Dinding sel bakteri *S. aureus* terdiri dari makromolekul yang disebut peptidoglikan, bisa tersusun atas zat tunggal atau dengan kombinasi zat lain. Dinding selnya tersusun atas lapisan peptidoglikan yang banyak sehingga tebal dan kaku (Tortora, 2013). Peptidoglikan merupakan suatu target yang tepat untuk obat antibakteri karena peptidoglikan hanya dijumpai pada bakteri, bukan pada manusia (Jawetz dkk. 2007). Dinding sel kebanyakan bakteri gram positif mengandung asam Teichoic dan asam teichuronic yang mengatur fungsi

elastisitas, porositas, kekuatan Tarik dan sifat elektrostatis dinding sel. Dinding sel bakteri memberi proteksi osmotik bagi bakteri, mempertahankan bentuk bakteri, meregulasi proses pembelahan sel dan menentukan karakteristik antigen bakteri (Jawetz, 2007).

a) Kapsul

Kapsul pada beberapa strain *S. aureus* menghasilkan eksopolisakarida yang dapat mencegah sel-sel polimorfonuklear untuk melakukan fagositosis (John dkk, 1989 dalam Selimovic, 2015).

b) Protein A

Dinding sel *S. aureus* mengandung protein unik yaitu protein A yang mampu mengikat ke Fc pada imunoglobulin G (IgG). Protein A terikat pada peptidoglikan untuk menghambat opsonisasi dan fagositosis oleh sel polimorfonuklear serta menghambat aktivasi komplemen (Selimovic, 2015).

c) Asam teikoat

Asam teikoat pada dinding sel bakteri *S. aureus* yang merupakan glikopolimer dinding sel yang dapat dikenali oleh serum anti-WTA IgG (respon imun spesifik) dan *mannose-binding lectin* (respon imun non-spesifik). Asam teikoat bertanggung jawab resistensi terhadap lisosom dan peptida antimikroba untuk menghindari respon imun inang (Kurokawa dkk, 2013 dalam Selimovic, 2015).

2. Eksoprotein

Staphylococcus aureus menghasilkan beberapa enzim yang menyebabkan virulensi diantaranya adalah: katalase, koagulase, fibrinolisin, hyaluronidase, lipase, fosfatidil inositol-fosfolipase spesifik C (Selimovic, 2015).

a) Katalase

Staphylococcus aureus menghasilkan katalase yang dapat menonaktifkan hidrogen peroksida beracun dan radikal bebas yang terbentuk oleh mieloperoksidase setelah melakukan fagositosis. Katalase dapat melindungi mikroba intrafagositik dengan menghancurkan hidrogen peroksida yang diproduksi oleh sel-sel fagosit (Park dkk., 2008 dalam Selimovic, 2015).

b) Koagulase

Koagulase dapat melapisi permukaan bakteri dengan fibrin agar resisten terhadap opsonisasi dan fagositosis. Selama infeksi, *S. aureus* menyekresikan 2 tipe koagulase yaitu *Coa* dan *vWbp* (*von Willebrand factor binding protein*). Setelah berikatan dengan fibrinogen dan protrombin, menghasilkan gumpalan fibrin yang dapat melindungi *S. aureus* dan mencegah perluasan infeksi (Mc Adow dkk, 2012 dalam Selimovic, 2015).

c) Fibrinolisin

Fibrinolisin dapat mendegradasi fibrin sehingga memfasilitasi penyebaran infeksi ke jaringan sekitarnya (Koch dkk, 2012 dalam Selimovic, 2015).

d) Hyaluronidase

Hyaluronidase dapat membelah ikatan β -1,4 glikosidik dari glikosaminoglikan pada matriks ekstraseluler jaringan, yang memungkinkan *S.*

aureus segera menyebar di lingkungan sekitarnya (Ibberson dkk, 2014 dalam Selimovic, 2015).

e) Lipase

Lipase merupakan enzim yang memungkinkan *S. aureus* menyebar pada kulit dan jaringan subkutan, penyebab furunkulosis kronik. Sekitar 86% isolat *S. aureus* dari luka manusia, positif dapat memproduksi lipase yang menunjukkan indikasi adanya kerusakan jaringan (Rodriguez dkk, 2014 dalam Selimovic, 2015).

3. Eksotoksin

Staphylococcus aureus memproduksi eksotoksin yang memiliki aktivitas sitolitik. Racun sitolitik (*cytolysin*) berupa pori β -silinder dalam membran plasma menyebabkan kebocoran dalam sel sehingga melisis sel target. *S. aureus* mensekresikan beberapa *cytolysins*, termasuk α -hemolisin, β -hemolisin, γ -hemolisin, *leukocidin*, dan *Panton-Valentine Leukocidin* (PVL) (Bien dkk, 2011).

Staphylococcus aureus menghasilkan tiga jenis β -laktamase. Produksi enzim ini dapat diinduksi atau secara langsung diproduksi, membuat organisme ini tahan terhadap antibiotik β -laktam. Sintesis dari enzim yang dikode oleh gen yang ada di plasmid dan berperan dalam resistensi terhadap beberapa antibiotik lain seperti eritromisin dan tetrasiklin (Wadvogel, 1995 dalam Selimovic, 2015). β -laktamase mengkatalisis reaksi hidrolisis dan pembukaan cincin β -laktam yang mengakibatkan penonaktifannya (Mirovic, 2003 dalam Selimovic, 2015).

2.4 Perhitungan Jumlah Koloni Bakteri Metode Cawan

Prinsip metode hitungan cawan adalah jika sel mikroba yang masih hidup ditumbuhkan pada media, maka sel mikroba tersebut akan langsung berkembang biak dan membentuk koloni yang dapat dilihat secara langsung, dan kemudian dihitung tanpa menggunakan mikroskop. Metode hitung cawan memiliki keuntungan antara lain hanya sel yang masih hidup yang dapat dihitung, beberapa jenis mikroba dapat dihitung sekaligus, dapat digunakan untuk isolasi dan identifikasi mikroba karena koloni yang terbentuk mungkin berasal dari sel mikroba dengan penampakan pertumbuhan yang spesifik (Waluyo, 2010).

Perhitungan jumlah bakteri yang tumbuh dilakukan dengan metode *Standard Plate Count* (SPC) menggunakan rumus sebagai berikut (Waluyo, 2010):

$$\text{Koloni per ml atau per gram} = \text{jumlah koloni per cawan} \times \frac{1}{\text{faktor pengenceran}}$$

Laporan dari hasil menghitung dengan cara hitungan cawan menggunakan standar yang disebut *Standard Plate Count* (SPC) sebagai berikut:

1. Cawan yang dipilih dan dihitung adalah yang mengandung jumlah koloni antara 30-300. Jika tidak ada yang memenuhi syarat yang dipilih yang jumlahnya mendekati 300.
2. Beberapa koloni yang bergabung menjadi satu merupakan suatu kumpulan koloni yang besar dimana jumlah koloninya diragukan dapat dihitung sebagai satu koloni.

3. Suatu deretan rantai koloni yang terlihat sebagai suatu garis tebal dihitung sebagai satu koloni.
4. Tidak ada koloni yang menutup lebih besar dari setengah luas petri disk, koloni demikian dinamakan *spreader*.
5. Perbandingan jumlah bakteri hasil pengenceran yang berturut-turut antara pengenceran yang lebih besar dengan pengenceran sebelumnya; jika sama atau lebih kecil dari 2 hasilnya dirata-rata. Tetapi jika lebih besar dari 2 yang dipakai jumlah mikroba dari hasil pengenceran sebelumnya.
6. Jika dengan ulangan setelah memenuhi syarat hasilnya dirata-rata.

Dalam *Standard Plate Count* (SPC) ditentukan cara pelaporan dan perhitungan koloni sebagai berikut (Waluyo, 2010):

1. Hasil yang dilaporkan hanya terdiri dari dua angka yakni angka pertama (satuan) dan angka kedua (desimal). Jika angka ketiga sama dengan atau lebih besar daripada 5, harus dibulatkan satu angka lebih tinggi pada angka kedua. Sebagai contoh, didapatkan $1,7 \times 10^4$ unit koloni/ml atau $2,0 \times 10^6$ unit koloni/gram.
2. Jika pada semua pengenceran dihasilkan kurang dari 30 koloni per cawan petri, berarti pengenceran yang dilakukan terlalu tinggi. Karena itu, jumlah koloni pada pengenceran yang terendah yang dihitung. Hasilnya dilaporkan sebagai kurang dari 30 dikalikan dengan besarnya pengenceran, tetapi jumlah yang sebenarnya harus dicantumkan di dalam tanda kurung.
3. Jika pada semua pengenceran dihasilkan lebih dari 300 koloni pada cawan petri, berarti pengenceran yang dilakukan terlalu rendah. Karena itu, jumlah

koloni pada pengenceran yang tertinggi yang dihitung. Hasilnya dilaporkan sebagai lebih dari 300 dikalikan dengan faktor pengenceran, tetapi jumlah yang sebenarnya harus dicantumkan di dalam tanda kurung.

4. Jika jumlah cawan dari dua tingkat pengenceran dihasilkan koloni dengan jumlah antara 30 dan 300, dan perbandingan antara hasil tertinggi dan terendah dari kedua pengenceran tersebut lebih kecil atau sama dengan dua, dilaporkan rata-rata dari kedua nilai tersebut dengan memperhitungkan faktor pengencerannya. Jika perbandingan antara hasil tertinggi dan terendah lebih besar daripada 2, yang dilaporkan hanya hasil yang terkecil.
5. Jika digunakan dua cawan petri (duplo) per pengenceran, data yang diambil harus dari kedua cawan tersebut, tidak boleh dari satu. Oleh karena itu, harus dipilih tingkat pengenceran yang menghasilkan kedua cawan duplo dengan jumlah koloni antara 30 dan 300.

2.5 Sistem Imunitas

Sistem imun merupakan sistem koordinasi respons biologik yang bertujuan melindungi integritas dan identitas individu serta mencegah invasi organisme dan zat yang berbahaya di lingkungan yang dapat merusak dirinya. Sistem imun mempunyai sedikitnya 3 fungsi utama. Yang pertama adalah suatu fungsi yang sangat spesifik yaitu kesanggupan untuk mengenal dan membedakan berbagai molekul target sasaran dan juga mempunyai respons yang spesifik. Fungsi kedua adalah kesanggupan membedakan antara antigen diri dan antigen asing. Fungsi ketiga adalah fungsi memori yaitu kesanggupan melalui pengalaman

kontak sebelumnya dengan zat asing patogen untuk bereaksi lebih cepat dan lebih kuat daripada kontak pertama (Munasir, 2001).

Sel yang terlibat dalam sistem imun berupa sel yang bersirkulasi dalam darah. Keberadaan sel tersebut dapat dijumpai pada organ limfoid dan dapat pula tersebar ke jaringan tubuh kecuali *central nervous system* (CNS). Sistem imun mempunyai mekanisme kerja meliputi: pertama, kerjasama dengan sel lain untuk mengenali antigen dan untuk berkembang menjadi sel efektor. Kedua, mampu keluar-masuk antara sirkulasi dan jaringan, mempunyai daya migrasi menuju jaringan terinfeksi dan homing pada daerah yang terinfeksi tersebut. Ketiga, limfosit yang spesifik harus mampu menerima stimuli dan melakukan penggandaan klon terhadap antigen yang sesuai. Keempat, limfosit menempati organ yang menguntungkan untuk terjadinya pertemuan dengan antigen dan juga mendukung perkembangan dan defisiensinya (Rifa'i, 2011).

Secara umum sel limfosit merupakan sel yang mampu mengenal dan menghancurkan berbagai determinan antigenik yang memiliki dua sifat pada respon imun khusus yaitu spesifitas dan memori. Populasi sel limfosit dapat dibedakan berdasarkan perbedaan fungsi dalam subset yang dapat membedakan status diferensiasi, lokalisasi, anatomi dan jalur perkembangannya. Beberapa subset limfosit memiliki perbedaan fungsi, jenis protein yang diproduksi dan morfologinya (Abbas, 2007). Limfosit memiliki sisi ikatan khusus sebagai varian prototype reseptor antigen sehingga berperan sebagai respon imun spesifik. Reseptor antigen pada limfosit B adalah bagian membrane yang berikatan dengan antibodi akan disekresikan setelah limfosit B mengalami diferensiasi menjadi sel

fungsional, sedangkan reseptor antigen pada limfosit T bekerja mendeteksi bagian protein asing yang masuk ke dalam sel inang (Janeway, 2001).

Sistem pertahanan tubuh atau respons imun yang terjadi sebagai akibat adanya antigen seperti contoh invasi bakteri *S. aureus* masuk ke dalam tubuh maka akan dieliminasi oleh neutrofil dan makrofag yang berperan pada sistem imun innate. Selain itu makrofag juga dapat berperan sebagai *antigen presenting cells* (APC). Di dalam makrofag, bakteri akan difagositosis kemudian dikenali oleh *major histocompatibility complex* II (MHC II), kemudian akan dipresentasikan dalam bentuk antigen peptida. Selanjutnya, MHC II akan berikatan dengan limfosit T. Limfosit T diketahui mempunyai beberapa molekul permukaan atau *cluster of differentiation* (CD). Antigen peptida yang telah dipresentasikan oleh MHC II akan berikatan dengan limfosit Th (*T helper* CD4) pada bagian *T Cell Receptor* (TCR) (Abbas, 2007).

Sel T CD4⁺ yang teraktivasi akan kehilangan CD62L dan mengekspresikan berbagai molekul permukaan seperti CD25, CD44, CD69 yang bertujuan untuk melawan dan mengatur aktivitas sel efektor yang teraktivasi akibat adanya paparan antigen bakteri (Rifa'i, 2011). Sel T CD4⁺ efektor akan mensekresikan sitokin interferon gamma (IFN- γ) yang berfungsi sebagai aktivasi makrofag, fagositosis, dan *killing* bakteri. Sel T CD4⁺ juga akan menghasilkan sitokin salah satunya interleukin 2 (IL-2) yang memicu aktivasi sel T sitotoksik (CD8⁺) dan sel T regulator (Reg) (Abbas, 2007).

2.6 Sitokin

2.6.1 Definisi Sitokin

Sitokin merupakan kelompok protein (polipeptida) yang diproduksi sebagai respon terhadap rangsangan mikroba dan antigen lainnya dan berperan sebagai mediator pada reaksi imun dan inflamasi. Sekresi sitokin terjadi cepat dan hanya sebentar, tidak disimpan sebagai molekul *preformed*. Kerjanya sering bersifat *pleiotropic* (satu sitokin bekerja terhadap berbagai jenis sel yang menimbulkan efek yang sama). Oleh karena itu efek antagonis satu sitokin tidak akan menunjukkan hasil nyata, karena ada kompensasi dari sitokin yang lain. Sitokin sering berpengaruh terhadap sintesis dan efek sitokin yang lainnya. Adapun efek sitokin dapat bersifat lokal maupun sistemik, dimana sinyal dari luar mengatur ekspresi reseptor sitokin atau respon sel terhadap sitokin. Efek sitokin tersebut dapat terjadi melalui ikatan dengan reseptornya pada membran sel target. Respon seluler terhadap kebanyakan sitokin terdiri atas perubahan ekspresi gen terhadap sel target yang menimbulkan ekspresi fungsi baru dan kadang menyebabkan proliferasi sel target (Baratawidjaja, 2014).

Sitokin merupakan protein pembawa pesan kimiawi, atau perantara dalam komunikasi antar sel yang sangat poten dan aktif pada kadar yang sangat rendah yaitu sekitar $10^{-10} - 10^{-15}$ mol/l dapat merangsang sel target. Reseptor yang diekspresikan dan afinitasnya merupakan faktor kunci respon seluler. Jadi sitokin berperan dalam aktivasi sel T, sel B, makrofag, inflamasi dan induksi sitotoksitas. Beberapa jenis sitokin juga mempunyai efek anti-neoplastik dan fungsi dalam hematopoiesis. Sitokin yang berperan pada imunitas spesifik dan

nonspesifik umumnya diproduksi oleh berbagai sel dan bekerja terhadap sel target yang berbeda, meskipun tidak mutlak. Hal tersebut disebabkan karena sitokin yang sama dapat diproduksi selama reaksi imun spesifik dan nonspesifik. Beberapa sitokin yang diproduksi juga dapat menunjukkan reaksi yang tumpang tindih (Baratawidjaja, 2014).

Sifat umum dari sitokin dapat dilihat dari efek yang ditimbulkan, yaitu ada efek langsung dan tidak langsung. Efek langsung meliputi: lebih dari satu efek terhadap berbagai jenis sel (pleiotropi), autoregulasi (fungsi autokrin), dan terhadap sel yang letaknya tidak jauh (fungsi parakrin). Sedangkan efek tidak langsung meliputi: menginduksi ekspresi reseptor untuk sitokin lain atau bekerjasama dengan sitokin lain dalam merangsang sel (sinergisme), dan mencegah ekspresi reseptor atau produksi sitokin (antagonisme) (Baratawidjaja, 2014).

2.6.2 Interleukin 10 (IL-10)

Interleukin 10 (IL-10) atau *cytokines synthesis inhibitory factor* merupakan protein yang larut dan terdiri dari 160 asam amino dengan berat molekul sekitar 18 kD. IL-10 terdiri dari dua ikatan disulfide intra molekul dan bersifat labil. Struktur IL-10 lebih didominasi oleh helix, serta diduga berasal dari bagian IL-2, IL-4, dan IFN. Sekresi sitokin ini berasal dari sel T, sel B, monosit, makrofag, sel dendritik, sel mast, sel eosinophil, keratinosit, hepatosit, sel epitel, sel astrosit dan lain sebagainya. IL-10 bukanlah merupakan sitokin yang khusus atau senyawa yang berasal dari Th₂ dan gambaran ekspresinya lebih menyerupai IL-6 daripada IL-4

atau IL-5. Hampir pada sebagian besar proses inflamasi, golongan sel monosit merupakan sumber terbesar dari IL-10 (Soeroso, 2007).

IL-10 dapat diinduksi seperti oleh kuman-kuman patogen yang akan mengaktifasi monosit ataupun makrofag, seperti halnya komponen dinding sel bakteri, parasite intra seluler, jamur, imunodefisiensi pada manusia dan EBV, kondisi stress seluler (hipoksia) (Soeroso, 2007).

IL-10 juga menunjukkan aktifitas imunostimulator, dimulai sejak IL-10 meningkatkan proliferasi dan aktivitas sitotoksik limfosit T, serta merangsang kemoatraktan. Secara bersamaan dikatakan bahwa IL-10 dapat merangsang aktivasi sel NK, dan meningkatkan rangsangan IL-2 terhadap proliferasi sel NK, serta sitotoksisitas dan pengeluaran sitokin lain. Akhirnya IL-10 merupakan sitokin yang potensial terhadap proliferasi dan faktor diferensiasi terhadap sel limfosit B dalam mempromosikan sintesa dari IgM, IgG, dan IgA. Semua peran tersebut merupakan tugas IL-10 dalam meningkatkan regulasi reseptor ekspresi dalam monosit, disamping meningkatkan *antibody-mediated cellular cytotoxicity* (Soeroso, 2007).

IL-10 juga diduga berfungsi sebagai pengontrol proses inflamasi proses alergi. Dugaan ini berdasarkan observasi yang menunjukkan bahwa IL-10 dapat menurunkan regulasi produksi IL-5 oleh sel T. sementara itu, IL-5 merupakan sitokin yang berperan dalam diferensiasi dan aktivasi fungsi eosinophil, yaitu dengan mengontrol akumulasi eosinophil dalam jaringan yang meradang. Saat ini dinyatakan bahwa eosinophil mengekspresi fungsional CD40 pada permukaannya

dan mengikatnya dengan antibody spesifik (*natural ligand*), untuk memperpanjang kehidupannya (Soeroso, 2007).

IL-10 merupakan inhibitor makrofag dan sel dendritik yang berperan dalam mengontrol reaksi imun non spesifik dan imun seluler. IL-10 diproduksi terutama oleh makrofag yang diaktifkan. Hal tersebut merupakan contoh dari regulator *feedback* negatif. IL-10 mencegah produksi IL-12 oleh makrofag dan sel dendritik yang diaktifkan. IL-10 mencegah ekspresi kostimulator molekul MHC-II pada makrofag dan sel dendritik (Baratawidjaja, 2014).

Penelitian baru-baru ini, menunjukkan bahwa IL-10 penting selama infeksi akut baik infeksi lokal maupun sistemik. Induksi IL-10 mempunyai pengaruh yang berlawanan tergantung pada bagian yang terinfeksi, mungkin disebabkan oleh perbedaan lingkungan sel yang kontak dengan bakteri misalnya *Staphylococcus aureus*. Selama infeksi akut sistemik induksi IL-10 membantu inang dalam mencegah perkembangan infeksi sistemik. Sedangkan selama infeksi akut lokal induksi IL-10 membantu keberadaan atau kolonisasi bakteri *s.aureus* di bagian tertentu (Leech dkk, 2017).

2.7 Enzim-linked immunosorbent assay (ELISA)

2.7.1 Definisi ELISA

Enzim-linked immunosorbent assay (ELISA) atau dalam bahasa Indonesianya disebut sebagai uji penentuan kadar imunisorben taut-enzim, merupakan teknik pengujian serologi yang didasarkan pada prinsip interaksi antara antibody dan antigen. Pada awalnya, teknik *ELISA* hanya digunakan dalam bidang imunologi untuk mendeteksi keberadaan antigen maupun antibodi dalam

suatu sampel seperti dalam pendeteksian antibody IgM, IgG, dan IgA pada saat terjadi infeksi (pada tubuh manusia khususnya). Namun seiring dengan perkembangan ilmu pengetahuan, teknik *ELISA* juga diaplikasikan dalam bentuk lain termasuk untuk menganalisis kadar hormon yang terdapat dalam suatu organisme. Antigen yang berlabel dan antigen yang tidak berlabel saling bersaing untuk berikatan dengan antibodi yang terdapat dalam jumlah terbatas (Hausmann, 2007).

ELISA diperkenalkan pada tahun 1971 oleh Peter Perlmann dan Eva Engvall untuk menganalisis adanya interaksi antigen dengan antibodi di dalam suatu sampel dengan menggunakan enzim sebagai pelapor (Hausmann, 2007). Prinsip dari pemeriksaan *Enzim-linked immunosorbent assay (ELISA)* adalah reaksi antigen-antibodi (Ag-Ab) dimana setelah penambahan konjugat yaitu antigen atau antibodi yang dilabeli enzim dan substrat akan terjadi perubahan warna. Saat cahaya dengan panjang gelombang tertentu disinarkan pada suatu sampel, kompleks antigen atau antibodi akan berfluoresensi sehingga jumlah antigen pada sampel dapat disimpulkan berdasarkan besarnya fluoresensinya. Perubahan warna ini yang nantinya akan diukur intensitas atau absorbansinya dengan alat pembaca yang disebut spektrofotometer atau dikenal dengan *ELISA Reader* dengan menggunakan panjang gelombang tertentu (Primadharsini, 2013).

Hasil dari teknik *ELISA* terdiri dari 2 bentuk yaitu kualitatif dan kuantitatif. Hasil secara kualitatif adalah perubahan warna pada *well plate* atau *microplate* yang mengindikasikan bahwa terjadi reaksi yang spesifik antara suatu antigen dengan antibodi. Perubahan warna tersebut dihasilkan oleh reaksi antara substrat

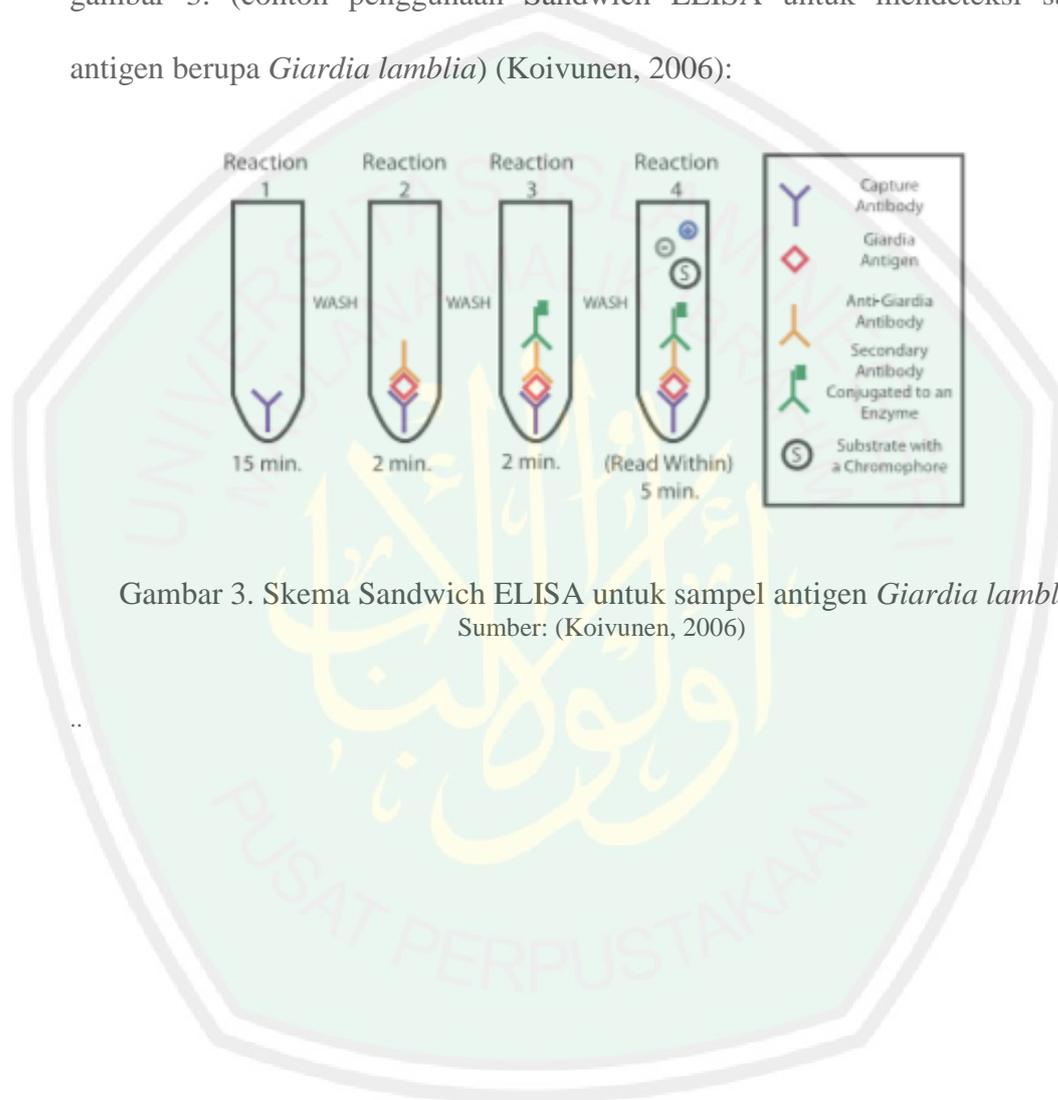
dengan enzim yang terdapat di anti-antibodi. Sedangkan hasil secara kuantitatif berupa nilai atau besaran konsentrasi dan nilai absorbansi masing-masing sampel. Intensitas cahaya yang diserap oleh sampel pada panjang gelombang tertentu berbanding lurus dengan besar nilai absorbansi. Semakin banyak intensitas cahaya yang diserap, maka semakin besar nilai absorbansinya. Begitu juga apabila semakin kecil nilai intensitas cahaya yang diserap oleh sampel, maka akan semakin kecil pula nilai absorbansinya (Crowther, 2001).

ELISA terdiri dari beberapa jenis diantaranya Direct, Indirect, Sandwich, dan Kompetitif *ELISA* yang memiliki perbedaan dalam mekanisme pengikatan antara antigen dan antibodi. Penelitian ini akan menggunakan metode *ELISA* jenis Sandwich (Koivunen, 2006).

2.7.2 Jenis Teknik *ELISA*

Sandwich ELISA menggunakan sampel yang pertama-tama dimasukkan ke dalam *well plate* atau *microplate* yang telah dilapisi dengan antigen-antibodi spesifik. Jika antigen dalam sampel telah berada pada *well plate* atau *microplate* maka antigen tersebut akan berikatan dengan antibodi. Sampel yang tidak berikatan dengan antibodi dapat dihilangkan dengan pencucian, dan kemudian ditambahkan antibodi sekunder. Prinsip dasar dari sandwich *ELISA* adalah sampel yang mengandung antigen direaksikan dengan antibodi spesifik pertama yang terikat dengan fase padat, selanjutnya ditambahkan antibodi spesifik kedua yang berlabel enzim dan ditambahkan substrat dari enzim tersebut (Koivunen, 2006).

Persyaratan untuk keberhasilan Sandwich ELISA adalah antigen yang besar berisi epitope yang berbeda setidaknya untuk 2 antibodi yang berbeda. Prinsip pengikatan antigen-antibodi dalam Sandwich ELISA dapat dilihat pada gambar 3. (contoh penggunaan Sandwich ELISA untuk mendeteksi sampel antigen berupa *Giardia lamblia*) (Koivunen, 2006):



Gambar 3. Skema Sandwich ELISA untuk sampel antigen *Giardia lamblia*
Sumber: (Koivunen, 2006)

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan jenis penelitian eksperimental laboratorium menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan 5 perlakuan dan 5 ulangan. Pembagian perlakuan tersebut antara lain:

- Normal: mencit jantan normal, tanpa infeksi *S aureus* dan tanpa pengobatan.
- K+ (kontrol positif): mencit jantan normal, infeksi *S aureus* dan diberi pengobatan antibiotik ceftobiprole.
- P0 (perlakuan 0 atau kontrol negatif): mencit jantan normal, infeksi *S aureus* dan tanpa pengobatan.
- P1 (perlakuan 1): mencit jantan normal yang diinfeksi *S aureus* dan diberi ekstrak biji alpukat sebanyak 600 mg/kg.
- P2 (perlakuan 2): mencit mencit jantan normal yang diinfeksi *S aureus* dan diberi ekstrak biji alpukat sebanyak 1200 mg/kg.

3.2 Populasi dan Sampel

Hewan coba yang digunakan adalah mencit (*Mus musculus*) jantan strain *Balb/c* berumur 8-12 minggu yang diperoleh dari Laboratorium Hewan Coba Jurusan Biologi Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang. Penentuan jumlah minimal sampel yang dibutuhkan

dihitung menggunakan rumus $t-1) (n-1) \geq 15$, dengan t merupakan jumlah perlakuan dan n adalah jumlah sampel per perlakuan. Pada penelitian ini, jumlah perlakuan adalah 5, sehingga besar sampel didapatkan dari nilai n sebagai berikut (Hanafiah, 1993):

$$\begin{aligned} (t-1) (n-1) &\geq 15 \\ (5-1) (n-1) &\geq 15 \\ 4 (n-1) &\geq 15 \\ 4n - 4 &\geq 15 \\ 4n &\geq 15 + 4 \\ n &\geq 19/4 \\ n &\geq 4,75 = 5 \end{aligned}$$

3.3 Variabel Penelitian

Variabel-variabel dalam penelitian ini adalah:

1. Variabel bebas

Pemberian ekstrak etanol biji alpukat (*Persea americana* Mill.) dan infeksi bakteri *S. aureus*.

2. Variabel terikat

Kadar IL-10 dan jumlah bakteri dalam darah mencit sebelum dan sesudah pemberian ekstrak etanol biji alpukat (*Persea americana* Mill.)

3. Variabel kontrol

- a. Jenis mencit: Mencit (*Mus musculus*) strain Balb/c, jantan, usia 8 hingga 12 minggu, berat badan 20-25 gram, gerak aktif dan bulu tidak rontok.
- b. Cara pemeliharaan: mencit diadaptasikan selama 7 hari di Laboratorium Hewan Coba sebelum perlakuan hingga mencit mencapai berat badan berkisar 20-25 gram. Mencit diberi makan pelet SP serta minum air mineral secara *ad libitum*
- c. Perlakuan: teknik pemberian ekstrak biji alpukat secara oral, injeksi bakteri *S. aureus* secara intraperitoneal.

3.4 Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Maret-April 2017 mulai dari pemeliharaan hewan coba hingga pengukuran kadar IL-10 dan perhitungan jumlah bakteri dalam darah. Penelitian ini dilakukan di beberapa tempat, yaitu:

1. Laboratorium Fisiologi Tumbuhan UIN Malang untuk pembuatan ekstrak etanol biji alpukat.
2. Laboratorium Mikrobiologi UIN Malang untuk peremajaan bakteri, pengenceran isolat bakteri *S. aureus*, uji konfirmasi, dan perhitungan jumlah bakteri dalam darah mencit.
3. Laboratorium Hewan Coba UIN Malang untuk pemeliharaan dan pemberian terapi pada hewan coba.
4. Laboratorium Genetika UIN Malang untuk pemeriksaan kadar IL-10

3.5 Alat dan Bahan

3.5.1 Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian meliputi *handglove*, masker, jas laboratorium, kandang bak plastik, tempat makan dan minum mencit, alat bius, *dysposable syringe* (jarum suntik) 1 ml 18 G, sonde lambung, spuit oral 1 cc, mikropipet 100-1000 μ l, *blue tip*, *rotary evaporator*, *blender*, neraca analitik, timbangan, oven, botol untuk ekstraksi, tabung ependorf, tabung reaksi, rak tabung reaksi, erlenmeyer, kertas saring, aluminium foil, *shaker inkubator*, *water bath*, corong *buchner*, pipet tetes, cawan petri, gelas ukur, mortar-mortil, inkubator, *hot plate stirrer*, botol flakon, bunsen, jarum ose, autoklaf, *Laminar Air Flow* (LAF), vortex, gunting, pinset, spatula, corong kaca, spektrofotometer, gelas beker, cuvet, sentrifus, *blood collect*, dan *ELISA Reader*.

3.5.2 Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain mencit (*Mus musculus*) Balb/c, pakan mencit SP, minum air mineral mencit, ekstrak biji alpukat (*Persea americana* Mill.), bakteri *S. aureus*, media *Mannitol Salt Agar* (MSA), media *Luria Bertani Broth*, antibiotik ceftobiprole, etanol p.a 96%, aquades, alkohol 70%, larutan *Phosphat Buffer Saline* (PBS), NaCl fisiologis 0,9%, plasma kelinci, *Mouse IL-10 (Interleukin 10) ELISA Kit* dengan nomor katalog: E-EL-M0046

3.6 Waktu dan Pelaksanaan Kegiatan Penelitian

Hari ke-	Kegiatan Penelitian
1-7	Aklimatisasi hewan coba
8	Injeksi <i>S. aureus</i> ke hewan coba
9	Inkubasi <i>S. aureus</i> dalam tubuh hewan coba

10	Uji konfirmasi keberadaan <i>S. aureus</i> dalam tubuh hewan coba dan pemeriksaan jumlah bakteri dalam darah sebelum pemberian terapi
11	Pengamatan hasil uji konfirmasi dan perhitungan hasil pemeriksaan jumlah bakteri dalam darah sebelum pemberian terapi
11-17	Pemberian terapi dengan ekstrak etanol 96% biji alpukat
18	Pegambilan sampel darah untuk pemeriksaan jumlah bakteri dalam darah setelah pemberian terapi dan pengukuran kadar IL-10 menggunakan ELISA Reader
19	Perhitungan hasil pemeriksaan jumlah bakteri dalam darah setelah pemberian terapi

3.7 Prosedur Penelitian

3.7.1 Aklimatisasi Hewan Coba

Sebelum dilakukan penelitian, terlebih dahulu disiapkan tempat pemeliharaan hewan coba meliputi kandang, serbuk kayu, tempat pakan, dan tempat minum. Kandang hewan coba dibersihkan setiap hari sejak dilakukan adaptasi sampai penelitian selesai. Sebanyak 25 ekor mencit diaklimatisasi di dalam laboratorium selama 7 hari dengan diberi pakan pellet SP dan minum air mineral secara *ad libitum* hingga tubuh hewan coba mencapai stabil dan memiliki berat badan 20-25 gram.

3.7.2 Persiapan Ekstrak Biji Alpukat (*Persea americana* Mill.)

1. Pengumpulan Biji Alpukat (*Persea americana* Mill.)

Pada penelitian ini digunakan biji alpukat (*Persea americana*.) yang diperoleh dari Perkebunan Alpukat di Dusun Sidolegi, Desa Pangklungan Kecamatan Wonosalam, Kabupaten Jombang. Varietas tanaman yang digunakan adalah alpukat (*Persea americana*) varietas hijau panjang.

2. Pembuatan Simplisia Biji Alpukat (*Persea americana* Mill.)

Biji alpukat (*Persea americana*) sebanyak 1 kg dicuci dengan air mengalir kemudian dipotong kecil-kecil dan dikeringkan dalam oven dengan suhu 40-50°C sampai kering (kadar air hilang dengan berat simplisia konstan). Simplisia yang sudah kering dihaluskan menggunakan *blender* (Putri, dkk). Dari hasil pengeringan, ditimbang 500 gram simplisia biji alpukat (*Persea americana*) kemudian dilakukan pengepakan dan penyimpanan di dalam plastik yang kering dan kedap udara.

3. Pembuatan Ekstrak Etanol 96% Biji Alpukat (*Persea americana* Mill.)

Simplisia biji alpukat (*Persea americana*) diekstraksi dengan metode maserasi menggunakan perbandingan 1:3. Pelarut yang digunakan adalah etanol 96% dengan pergantian pelarut setiap 24 jam sekali secara terus menerus selama 3 hari. Kemudian ekstrak cair tersebut disaring dan filtratnya dipekatkan menggunakan *rotary evaporator* pada suhu 50°C. (Putri dkk, 2015). Selanjutnya ekstrak diuapkan dalam oven pada suhu 55°C hingga mengental. Dalam penelitian ini dibutuhkan ekstrak kental biji alpukat sebanyak 10 gram.

3.7.3 Persiapan Bakteri *Staphylococcus aureus*

1. Sterilisasi Alat dan Bahan

Alat dan bahan dibungkus dengan kertas dan aluminium foil kemudian dimasukkan ke dalam plastik sebelum dilakukan sterilisasi. Sterilisasi dilakukan menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit dengan tekanan 1 atm (Hadioetomo, 1993).

2. Pembuatan Media

a. *Mannitol Salt Agar* (MSA)

Pembuatan media *Mannitol Salt Agar* (MSA) mengacu pada Hadioetomo (1993), yaitu ditimbang media *Mannitol Salt Agar* (MSA) sebanyak 8,64 gram, kemudian dilarutkan dalam aquades 80 ml. Selanjutnya dipanaskan di atas *hot plate stirrer* selama 15 menit. Setelah homogen, disterilkan media dalam autoklaf pada suhu 121°C dengan tekanan 1 atm selama 15 menit. Kemudian larutan didinginkan, dituang dalam cawan petri steril dan dibiarkan hingga memadat.

b. *Luria Bertani Broth* (LB)

Pembuatan media *Luria Bertani Broth* (LB) mengacu pada Hadioetomo (1993), yaitu ditimbang media *Luria Bertani Broth* sebanyak 2,25 gram, kemudian dimasukkan dalam gelas beker dan dilarutkan ke dalam 90 ml aquades lalu dimasukkan ke dalam erlenmeyer. Selanjutnya larutan dihomogenkan dengan cara dipanaskan diatas *hot plate stirrer* selama 15 menit. Setelah homogen, disterilkan dalam autoklaf pada suhu 121°C dengan tekanan 1 atm selama 15 menit.

3. Pemiakan Bakteri *Staphylococcus aureus*

a. Persiapan Bakteri *Staphylococcus aureus*

Isolat bakteri *S. aureus* dibiakkan pada cawan petri yang berisi media *Mannitol Salt Agar* (MSA) dan dibiarkan ±24 jam. Kemudian diambil 1 ose isolate bakteri dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang telah berisi aquades untuk membuat suspensi. Tahap selanjutnya dibuat seri pengenceran sampai 10⁻⁸.

Diambil 1 ml suspensi bakteri dan disebarakan diatas cawan petri kosong kemudian ditambahkan media MSA ±20 ml hingga merata (metode *pour plate*) dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam.

b. Persiapan Suspensi Uji *Staphylococcus aureus*

Persiapan suspensi uji bakteri *S. aureus* dilakukan dengan cara membuat seri pengenceran terlebih dahulu. Diambil 1 ose isolat bakteri dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang berisi aquades untuk membuat suspensi. Selanjutnya dibuat seri pengenceran sampai 10^8 . Selanjutnya diambil 1 ml dari masing-masing seri pengenceran kemudian dimasukkan ke dalam tabung reaksi steril yang berisi media *Luria Bertani Broth* (LB) dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Setelah itu dilanjutkan dengan spektrofotometri menggunakan panjang gelombang 600 nm untuk mengetahui konsentrasi *S. aureus* sebesar 10^8 cfu/ml (sesuai standard *Mc. Farland* 0,5) menurut Murray (1999) dilakukan perhitungan sebagai berikut:

$$N_1 \times V_1 = N_2 \times V_2$$

Keterangan:

N_1 = Konsentrasi bakteri hasil spektrofotometri ($OD_{600} = 1,3$ cfu/ml)

V_1 = Volume bakteri yang akan ditambah pengencer (ml)

N_2 = Konsentrasi bakteri yang dibutuhkan untuk infeksi (1×10^8 cfu/ml)

V_2 = Volume bakteri yang diperlukan (2,5 ml untuk 25 ekor mencit)

Berdasarkan perhitungan tersebut diperoleh volume bakteri yang akan ditambah pengencer (V_1) didapatkan hasil 10 ml yang diambil dari larutan stok yang dilakukan spektrofotometri OD_{600} ditambahkan pengencer (*Luria Bertani*

Broth) hingga volume bakteri 2,5 ml. Maka didapatkan volume bakteri *S. aureus* dengan konsentrasi 1×10^8 .

3.7.4 Infeksi dan Uji Konfirmasi *Staphylococcus aureus* pada Mencit

Dosis infeksi *S. aureus* mengacu pada Nakamura (2013), yaitu sebesar 10^8 cfu/ml. Setelah didapatkan jumlah sel bakteri 10^8 sel/ml, tahap berikutnya dilakukan sentrifugasi 10.000 rpm selama 10 menit pada suhu 25°C. Pelet yang diperoleh diresuspensi dengan 1 ml larutan PBS steril. Suspensi yang diperoleh kemudian diinjeksikan pada hewan coba sebanyak 100 μ l 1x secara intraperitoneal dan dilakukan uji konfirmasi (Mufidah dkk, 2013). Injeksi *S. aureus* dilakukan setelah proses aklimatisasi yaitu pada hari ke 8 sesuai kelompok perlakuan.

1. Uji Konfirmasi dengan Perhitungan Jumlah Koloni

Uji konfirmasi dilakukan untuk menentukan ada atau tidaknya bakteri *S. aureus* yang menginfeksi darah. Uji konfirmasi dilakukan pada hari ke-2 setelah injeksi bakteri karena masa inkubasi *S. aureus* 2 x 24 jam (Kobayashi dkk, 2015). Uji konfirmasi diawali dengan pengambilan darah mencit sebanyak 0,2-0,3 ml (FK UGM, 2014). Tahap selanjutnya mengacu pada penelitian Mufidah dkk (2013) yaitu dicairkan media *Mannitol Salt Agar* (MSA) di atas *hot plate stirrer*. Kemudian dimasukkan darah ke dalam 9 ml aquades steril (pengenceran 10^{-1}). Dilakukan pengenceran berseri hingga 10^{-9} . Diambil 1 ml hasil pengenceran 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} . dan dimasukkan dalam cawan petri. Selanjutnya ditambahkan media MSA yang telah dicairkan dengan metode tuang (*pour plate*) ke dalam cawan petri kemudian diratakan.

Tahap selanjutnya diinkubasi dalam inkubator pada suhu 37°C selama 24 jam. Setelah biakan diinkubasi, lalu dilakukan pengamatan perhitungan jumlah bakteri yang tumbuh dengan metode *Standard Plate Count* (SPC). Jumlah koloni dalam sampel dapat dihitung sebagai berikut:

$$\text{Koloni per ml atau per gram} = \text{jumlah koloni per cawan} \times \frac{1}{\text{faktor pengenceran}}$$

Laporan dari hasil menghitung dengan cara hitungan cawan menggunakan standar yang disebut *Standard Plate Count* (SPC) sebagai berikut:

1. Cawan yang dipilih dan dihitung adalah yang mengandung jumlah koloni antara 30-300. Jika tidak ada yang memenuhi syarat yang dipilih yang jumlahnya mendekati 300.
2. Beberapa koloni yang bergabung menjadi satu merupakan suatu kumpulan koloni yang besar dimana jumlah koloninya diragukan dapat dihitung sebagai satu koloni.
3. Suatu deretan rantai koloni yang terlihat sebagai suatu garis tebal dihitung sebagai satu koloni.
4. Tidak ada koloni yang menutup lebih besar dari setengah luas petri disk; koloni demikian dinamakan *spreader*.
5. Perbandingan jumlah bakteri hasil pengenceran yang berturut-turut antara pengenceran yang lebih besar dengan pengenceran sebelumnya; jika sama atau lebih kecil dari 2 hasilnya dirata-rata. Tetapi jika lebih besar dari 2 yang dipakai jumlah mikroba dari hasil pengenceran sebelumnya.
6. Jika dengan ulangan setelah memenuhi syarat hasilnya dirata-rata.

Dalam SPC ditentukan cara pelaporan dan perhitungan koloni sebagai berikut:

1. Hasil yang dilaporkan hanya terdiri dari dua angka yakni angka pertama (satuan) dan angka kedua (desimal). Jika angka ketiga sama dengan atau lebih besar daripada 5, harus dibulatkan satu angka lebih tinggi pada angka kedua. Sebagai contoh, didapatkan $1,7 \times 10^4$ unit koloni/ml atau $2,0 \times 10^6$ unit koloni/gram.
2. Jika pada semua pengenceran dihasilkan kurang dari 30 koloni per cawan petri, berarti pengenceran yang dilakukan terlalu tinggi. Karena itu, jumlah koloni pada pengenceran yang terendah yang dihitung. Hasilnya dilaporkan sebagai kurang dari 30 dikalikan dengan besarnya pengenceran, tetapi jumlah yang sebenarnya harus dicantumkan di dalam tanda kurung.
3. Jika pada semua pengenceran dihasilkan lebih dari 300 koloni pada cawan petri, berarti pengenceran yang dilakukan terlalu rendah. Karena itu, jumlah koloni pada pengenceran yang tertinggi yang dihitung. Hasilnya dilaporkan sebagai lebih dari 300 dikalikan dengan faktor pengenceran, tetapi jumlah yang sebenarnya harus dicantumkan di dalam tanda kurung.
4. Jika jumlah cawan dari dua tingkat pengenceran dihasilkan koloni dengan jumlah antara 30 dan 300, dan perbandingan antara hasil tertinggi dan terendah dari kedua pengenceran tersebut lebih kecil atau sama dengan dua, dilaporkan rata-rata dari kedua nilai tersebut dengan memperhitungkan faktor pengencerannya. Jika perbandingan antara hasil tertinggi dan terendah lebih besar daripada 2, yang dilaporkan hanya hasil yang terkecil.

5. Jika digunakan dua cawan petri (duplo) per pengenceran, data yang diambil harus dari kedua cawan tersebut, tidak boleh dari satu. Oleh karena itu, harus dipilih tingkat pengenceran yang menghasilkan kedua cawan duplo dengan koloni antara 30 dan 300.

Jika hasil uji konfirmasi diperoleh jumlah koloni bakteri yang mencapai 10^5 maka dapat dikategorikan bahwa mencit telah terinfeksi bakteri *Staphylococcus aureus*. Hal ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan Koleh Karlina dkk (2013) bahwa *Staphylococcus aureus* dengan jumlah 10^5 CFU/ml berpotensi menghasilkan toksin.

2. Uji Konfirmasi dengan Uji Koagulase

. Uji Koagulase dilakukan dengan 2 metode, yaitu uji *slide* dan uji tabung. Uji *slide* atau *clumping factor* digunakan untuk mengetahui adanya ikatan koagulase. Uji *slide* dikerjakan dengan cara setetes aquades atau NaCl fisiologis steril diletakkan pada kaca benda, kemudian satu ose biakan yang diuji disuspensikan. Setetes plasma diletakkan di dekat suspensi biakan tersebut, keduanya dicampur dengan menggunakan ose dan kemudian digoyangkan. Reaksi positif terjadi apabila dalam waktu 2-3 menit terbentuk presipitat granuler (Blucker dkk., 1994 dalam Dewi, 2013).

Uji tabung digunakan untuk mengetahui adanya koagulase bebas dengan cara 200 μ l plasma dimasukkan secara aseptis ke dalam tabung reaksi steril. Sebanyak 3-4 koloni biakan *S. aureus* yang diuji ditambahkan ke dalam tabung reaksi kemudian dicampur hati-hati. Selanjutnya, tabung dimasukkan ke dalam inkubator pada suhu 37°C . Pengamatan dilakuakn pada waktu 4 jam pertama, dan

sesudah 18-24 jam. Reaksi positif akan terjadi apabila terbentuk *clot* atau *jelly* dan ketika tabung dimiringkan *jelly* tetap berada di dasar tabung (Lay, 1994 dalam Dewi, 2013).

3.7.5 Pemberian Terapi Ekstrak Etanol 96% Biji Alpukat (*Persea americana* Mill.)

Pemberian terapi ekstrak etanol biji alpukat pada mencit dilakukan pada hari ketiga setelah injeksi selama 7 hari secara per oral menggunakan sonde. Dosis terapi yang diberikan yaitu 600 mg/kg BB dan 1200 mg/kg BB. Penentuan dosis yang digunakan mengacu pada penelitian Sutrisna (2015) bahwa dosis aman biji alpukat adalah 300 sampai 1200 mg/ kgBB/hari.

3.7.6 Pemberian dan Penentuan Dosis Cefotaxime

Pemberian cefotaxime pada mencit dilakukan pada hari ketiga selama 7 hari secara per oral menggunakan sonde. Dosis cefotaxime yang digunakan sebesar 500 mg/hari. Dosis ini dikonversikan ke mencit, dimana untuk manusia (70 kg) adalah setara dengan mengalikan dengan 0,0026 untuk 20 gram mencit. Dosis untuk 20 gram mencit = $500 \times 0,0026 = 1,3 \text{ mg}/20\text{gBB} = 26 \text{ mg}/\text{kgBB}$.

3.7.7 Pengambilan Sampel Darah

Pengambilan sampel darah dilakukan setelah 7 hari pemberian ekstrak etanol biji alpukat (*Persea americana*). Darah diambil melalui ekor mencit dengan terlebih dahulu membiusnya hingga pingsan dan tenang kemudian dibersihkan dengan kapas alkohol pada bagian ekor. Selanjutnya dipotong sedikit ujung ekor dan diurut sampai keluar darahnya. Darah yang keluar disedot dengan pipa kapiler lalu dimasukkan dalam tabung *ependoff* sampai mencapai volume $\pm 100 \mu\text{l}$.

kemudian diinkubasi pada suhu 28°C selama 30 menit dan selanjutnya disentrifus dengan kecepatan 10.000 rpm selama 10 menit sehingga diperoleh plasma (bagian supernatan) lalu disimpan pada suhu -20°C hingga waktu pengujian (Rini, 2013).

3.7.8 Perhitungan Jumlah Bakteri dalam Darah

Perhitungan jumlah baktei dalam darah dilakukan untuk menentukan ada atau tidaknya bakteri *S. aureus* yang ada di dalam darah. Pemeriksaan ini terkait dengan penyakit bakteremia yang diakibatkan infeksi *S.aureus*. Perhitungan jumlah bakteri setelah dipemberian terapi menggunakan ekstrak etanol 96% biji alpukat (*Persea. americana*) dilakukan dengan prosedur sama seperti uji konfirmasi pertama. Pengujiann ini bertujuan untuk mengetahui perbedaan jumlah koloni *S. aureus* yang menginfeksi darah sebelum dan sesudah pemberian terapi menggunakan ekstrak etanol 96% biji alpukat (*Persea. americana*).

3.7.9 Pemeriksaan Kadar IL-10

Pemeriksaan kadar sitokin IL-10 dilakukan dengan cara ELISA-Sandwich menggunakan sampel serum darah mencit yang telah diambil dari masing-masing perlakuan. Reagen yang digunakan adalah *Mouse IL-10 (Interleukin 10) ELISA Kit* dengan katalog nomor: E-EL-M0046. Prosedur pengujian dilakukan sesuai dengan katalog *Elabscience* bawaan dari *ELISA Kit* tersebut. Sebelum dilakukan analisis maka semua reagen yang diperlukan disiapkan dalam suhu ruang dan memformulasi semua reagen yang diperlukan.

Tahap pertama dimulai dengan menyiapkan *microplate* yang tersedia dalam *ELISA Kit* kemudian ditambahkan 100µl Standart, blanko, dan sampel pada masing-masing well dalam *microplate*. Kemudian blanko ditambahkan dengan

Reference Standard & Sample diluent kemudian *microplate* ditutup menggunakan *cover plate* dan diinkubasi selama 90 menit pada suhu 37°C. Setelah itu semua cairan di dalam *microplate* dibuang dan segera ditambahkan 100µL *Biotinylated Detection Ab* dan ditutup kembali menggunakan *cover plate* kemudian diinkubasi selama 60 menit pada 37° C. Tahap selanjutnya adalah proses *washing* yang terlebih dahulu semua cairan di dalam *microplate* dibuang kemudian dilakukan *washing* menggunakan *wash buffer* sebanyak 350µL pada masing-masing well dalam *microplate* dan dilakukan pengulangan *washing* sebanyak 3 kali. Setelah itu ditambahkan 100µL *HRP Conjugate* pada masing-masing well dalam *microplate* dan ditutup kembali menggunakan *cover plate* kemudian diinkubasi selama 30 menit pada suhu 37° C. Tahap selanjutnya dilakukan *washing* seperti yang telah dilakukan sebelumnya namun diulang sebanyak 5 kali, setelah itu ditambahkan 90µL *substrate solution* pada masing-masing well dalam *microplate* dan ditutup kembali menggunakan *cover plate* kemudian diinkubasi selama 15 menit pada suhu 37° C. Setelah itu ditambahkan 50µL *stop solution* pada kondisi gelap sehingga warna akan segera berubah menjadi kuning dan dilanjutkan dengan pengukuran nilai OD untuk mengetahui kadar IL-10 menggunakan ELISA *Reader* dengan panjang gelombang 450 nm (Elabscience, 2015).

3.8 Analisa Data

Dilakukan uji normalitas dan uji homogenitas pada data yang diperoleh. Apabila semua data terdistribusi normal dan homogen ($\alpha= 0,05$) kemudian dianalisis dengan Uji ANOVA (*Analysis of Variance*) One Way $\alpha=5\%$,

menggunakan program SPSS 16.0. Apabila terdapat perbedaan signifikan maka dilakukan analisis lebih lanjut dengan uji Duncan ($\alpha = 0.05$).



BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Pengaruh Ekstrak Etanol Biji Alpukat (*Persea americana* Mill.) terhadap Kadar Sitokin IL-10

Pengujian dalam penelitian ini dilanjutkan dengan uji ELISA yang bertujuan untuk mengetahui pengaruh ekstrak biji alpukat (*P. americana* Mill.) terhadap kadar IL-10 dalam darah mencit yang diinfeksi bakteri *S. aureus*. Dalam pengujian ini sampel yang digunakan berupa darah mencit sama seperti pengujian sebelumnya yang bertujuan untuk mengetahui jumlah koloni bakteri dalam darah. Seperti penjelasan Li, dkk (2015) bahwa dari hasil pemeriksaan keberadaan *S. aureus* tergantung pada tempat terjadinya infeksi. Jika bakteri terdapat dalam darah maka yang bertindak sebagai *antigen presenting cell* (APC) utama adalah monosit yang akan menyekresikan IL-10 berlimpah dalam jumlah tinggi sesuai dengan stimulus dari *S. aureus* sehingga menyebabkan terjadinya kolonisasi dan memfasilitasi penghindaran terhadap sistem kekebalan tubuh dan menyebabkan penyakit sepsis.

Adapun sitokin IL-10 merupakan salah satu jenis sitokin yang apabila diproduksi oleh tubuh maka akan mempengaruhi sel yang ada di sekitar mereka. Dalam hal ini IL-10 muncul akibat adanya bakteri dalam darah seperti yang dijelaskan oleh Soeroso (2007) bahwa IL-10 dapat diinduksi seperti oleh kuman-kuman patogen yang akan mengaktifasi monosit ataupun makrofag. Secara kuantitatif, monosit dan makrofag adalah sumber utama IL-10 dalam menanggapi *S. aureus*. Produksi IL-10 oleh monosit dan makrofag adalah antara 4- 20 kali

lebih tinggi daripada oleh DCs. Sebaliknya, ketika APC berupa DCs lebih dominan, *S. aureus* dapat memicu respons TH1 dan TH17 yang kuat. Perbedaan ini menunjukkan bahwa kapasitas immunomodulation oleh *S. aureus* tergantung pada jenis APC. Akibatnya, produksi IL-10 dapat berbeda karena hal ini terkait dengan deteksi *S. aureus* dalam jaringan yang berbeda berdasarkan komposisi selular yang menyusunnya juga berbeda-beda. Couper (2008) juga menjelaskan bahwa interaksi antara patogen berupa *S. aureus* dengan APC secara langsung dapat menyebabkan perkembangan populasi Th1, Th2, dan TReg. APC meningkatkan respon regulasi yang diinduksi oleh suatu kondisi yang sering melibatkan sinyal IL-10 atau menghasilkan modulasi langsung dari fungsinya akibat dari adanya patogen.

Allah SWT telah menciptakan tubuh setiap makhluknya dengan sempurna dan seimbang dengan adanya mekanisme tertentu di dalam tubuh yang seimbang dan menyesuaikan kondisi tubuh. Seperti yang termaktub dalam al-Quran surat al-Infithar (82) ayat 7-8 sebagai berikut:

الَّذِي خَلَقَكَ فَسَوَّاكَ فَعَدَلَكَ ﴿٧﴾ فِي أَيِّ صُورَةٍ مَّا شَاءَ رَكَّبَكَ ﴿٨﴾

“yang telah menciptakan kamu lalu menyempurnakan kejadianmu dan menjadikan (susunan tubuh)mu seimbang. Dalam bentuk apa saja yang Dia kehendaki, dan menyusun tubuhmu.” (Q.S. al-Infithar (82): 7-8)

Kedua ayat tersebut mengandung pernyataan Allah SWT terkait dengan penciptaan manusia dengan bentuk yang sempurna dan seimbang. Sayyid Quthub dalam Shihab (2002) menjelaskan tentang keistimewaan jasmani manusia yang menukil dari majalha ilmiah yang terbit di Inggris bahwa ciptaan Allah SWT yang sedemikian rupa begitu sempurna merupakan suatu perkara yang harus disyukuri

sebagai karuniaNya. Sebagai manusia yang memiliki derajat paling tinggi diantara semua ciptaanNya, dengan tubuh, akal, pikiran, dan roh yang sempurna maka patut untuk senantiasa berdzikir dan berfikir akan kebesaran Allah SWT.

Pada ayat tersebut apabila dipahami lebih dalam terdapat makna diciptakannya bagian-bagian tubuh termasuk organ yang memiliki bentuk dan fungsi tersendiri dalam menjalankan mekanisme tubuh sehingga mencapai homeostatis (kondisi seimbang). Contohnya ketika terdapat adanya suatu infeksi yang menyebabkan kondisi tubuh tidak seimbang sehingga menimbulkan penyakit maka akan terjadi suatu mekanisme diproduksinya suatu jenis sitokin yang menunjukkan kondisi tidak seimbang dalam tubuh dan dilanjutkan dengan mekanisme penyembuhan infeksi tersebut sehingga kembali mencapai homeostatis. Seperti dalam penelitian ini, ketika terdapat infeksi bakteri *S. aureus* maka akan terjadi sekresi sitokin salah satunya IL-10 sebagai respon imun terhadap adanya infeksi tersebut. Apabila paparan infeksi tersebut terjadi terus menerus maka dapat mengganggu fungsi organ dan mekanisme dalam tubuh menjadi tidak seimbang. Oleh karena itu perlu adanya pengobatan agar kondisi tubuh kembali seimbang salah satunya adalah dengan pemberian terapi ekstrak biji alpukat (*P. americana* Mill.) yang mengandung beberapa metabolit sekunder yang berfungsi dalam meningkatkan kekebalan tubuh setelah terjadinya infeksi, sehingga kondisi tubuh kembali sehat dan seimbang.

Dalam penelitian ini, pengamatan kadar IL-10 dalam darah mencit yang diinfeksi bakteri *S. aureus* menggunakan pengujian ELISA diperoleh data berupa

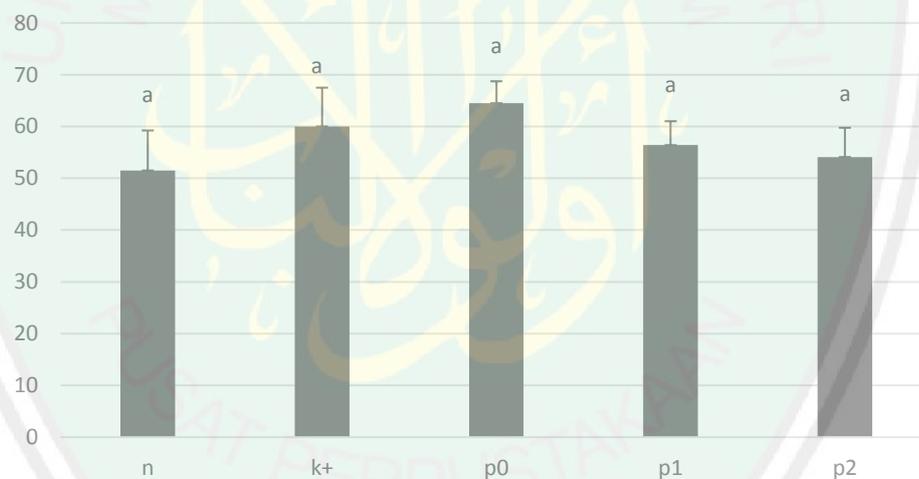
nilai rata-rata skoring kadar sitokin IL-10 dari masing-masing perlakuan dan ulangan yang dapat dilihat pada tabel 4.1 sebagai berikut:

Tabel 4.1 Hasil Perhitungan Rata-Rata Kadar Sitokin IL-10 dan Standar Deviasi

Perlakuan	Rata-rata \pm Standart Deviasi
N (normal)	51,5 \pm 7,74 ^a
K+ (kontrol positif)	60 \pm 7,50 ^a
P0 (dosis 0 mg/kg BB)	64,5 \pm 4,23 ^a
P1 (dosis 600 mg/kg BB)	56,4 \pm 4,62 ^a
P2 (dosis 1200 mg/kg BB)	54,1 \pm 5,66 ^a

Keterangan:

- Notasi sama menunjukkan tidak ada perbedaan yang nyata
- Nilai rata-rata kadar sitokin IL-10 dinyatakan dengan satuan pg/ml



Gambar 4.1 Diagram rata-rata kadar sitokin IL-10 dalam darah mencit

Keterangan:

- N : Normal
 K+ : Kontrol positif (kontrol obat)
 P0 : Kontrol negatif/perlakuan dosis 0 mg/kg BB
 P1 : Perlakuan dosis 600 mg/kg BB
 P2 : Perlakuan dosis 1200 mg/kg BB

Berdasarkan data hasil pengamatan diatas, sebelum dilakukan analisa statistik diketahui bahwa rata-rata kadar sitokin IL-10 pada mencit normal (tanpa

perlakuan) mulai ulangan ke-1 sampai ulangan ke-5 adalah sebesar 51,5 pg/ml. Untuk perlakuan kontrol positif (K+) atau perlakuan obat menunjukkan nilai rata-rata kadar sitokin IL-10 sebesar 60 pg/ml. Perlakuan tanpa pemberian dosis obat maupun ekstrak (P0) menunjukkan nilai rata-rata kadar sitokin IL-10 sebesar 64,5 pg/ml. Sedangkan pada perlakuan P1 (dosis ekstrak 600 mg/kg BB) nilai rata-rata kadar sitokin IL-10 sebesar 56,4 pg/ml dan P2 (dosis ekstrak 1200 mg/kg BB) sebesar 54,1 pg/ml.

Kadar IL-10 tertinggi adalah pada perlakuan (P0) atau mencit yang tidak diberi ekstrak biji alpukat (*P. americana* Mill.). Sedangkan kadar IL-10 terendah ada pada tiap perlakuan adalah P2 dan disusul dengan P1 mendekati dengan hasil perlakuan N (normal). Dalam hasil tersebut dapat disimpulkan bahwa semakin banyak dosis ekstrak biji alpukat (*P. americana* Mill.) yang diberikan maka kadar IL-10 semakin menurun dan berhubungan dengan berkurangnya kolonisasi bakteri dalam darah. Hal ini sesuai dengan penjelasan Leech, dkk (2017) bahwa IL-10 penting selama infeksi akut baik infeksi lokal maupun sistemik. Induksi IL-10 mempunyai pengaruh yang berlawanan tergantung pada bagian yang terinfeksi, mungkin disebabkan oleh perbedaan lingkungan sel yang kontak dengan bakteri misalnya *Staphylococcus aureus*. Selama infeksi akut sistemik induksi IL-10 membantu inang dalam mencegah perkembangan infeksi sistemik. Sedangkan selama infeksi akut lokal induksi IL-10 membantu keberadaan atau kolonisasi bakteri *S. aureus* di bagian tertentu.

Data tersebut kemudian dianalisis statistik menggunakan *SPSS 16.0 for Windows* untuk memastikan pengaruh dari ekstrak biji alpukat (*P.*

americana Mill.) terhadap kadar IL-10 dalam darah mencit yang diinjeksi bakteri *S. aureus*. Adapun hasil uji normalitas dengan *Kolmogorov-Smirnov* menunjukkan bahwa data terdistribusi normal karena memiliki nilai signifikansi sebesar 0,895 ($p > 0,05$). Hasil uji homogenitas pada *Levene test* memiliki nilai signifikansi sebesar 0,073 ($p > 0,05$), sehingga dapat disimpulkan bahwa kadar sitokin IL-10 pada semua perlakuan memiliki variansi yang sama pada tiap perlakuan (homogen). Oleh karena data yang diperoleh normal dan homogen maka dilanjutkan dengan uji *ANOVA One Way* dengan taraf signifikansi 1%.

Hasil uji *ANOVA One Way* diperoleh nilai signifikansi sebesar 0,345 ($p > 0,05$) sehingga dapat disimpulkan bahwa hipotesa 1 (H1) ditolak dan hipotesa 0 (H0) diterima. Hal ini menunjukkan bahwa pemberian ekstrak biji alpukat (*P. americana* Mill.) tidak berpengaruh secara signifikan terhadap kadar sitokin IL-10 mencit yang diinfeksi bakteri *S. aureus*. Adapun setelah dilakukan uji *ANOVA One Way* dilanjutkan dengan uji *Duncan* untuk mengetahui perbedaan antar perlakuan yang berpengaruh terhadap kadar sitokin IL-10.

Hasil uji *Duncan* menunjukkan nilai signifikansi sebesar 0,91 ($p > 0,05$), yang artinya tidak menunjukkan adanya perbedaan yang nyata pada semua perlakuan, sehingga antara perlakuan normal, perlakuan kontrol positif (K+), perlakuan P0, P1, dan P2 hasilnya sama meski diberi perlakuan yang berbeda berupa infeksi bakteri atau tanpa infeksi dan diberi perlakuan terapi ekstrak maupun terapi antibiotik.

Penelitian ini menggunakan ekstrak biji alpukat (*P. americana* Mill.) sebagai terapi karena kandungan metabolit sekunder di dalamnya yang memiliki

efek terhadap sistem imun. Diantara kandungan metabolit sekunder pada biji alpukat, satu diantaranya yang berpotensi sebagai imunomodulator adalah saponin. Saponin yang terkandung dalam biji alpukat (*P. americana*) berkhasiat dalam meningkatkan sistem kekebalan tubuh, memperbaiki tingkat gula darah, menguatkan fungsi hati dan memperlambat proses pembekuan darah (Rasyad (2012). Menurut Ilozue dkk (2014), saponin juga berkhasiat sebagai obat antiinflamasi, antikarsinogenik, dan antilipidemik. Saponin merupakan senyawa aktif yang memiliki kemampuan dalam meningkatkan respon imunitas tubuh yang terinfeksi bakteri karena berfungsi sebagai imunomodulator alami terutama untuk meningkatkan jumlah sel-sel imunokompeten seperti sel makrofag, sel-T dan sel-B (Faizah, 2014). Saponin juga memiliki kemampuan untuk menginduksi produksi sitokin seperti interleukin (IL) dan interferons (IFN) yang berperan dalam efek imunostimulan (Mahima dkk, 2013).

Berdasarkan hasil tersebut diketahui bahwa meskipun secara literatur biji alpukat (*P. americana* Mill.) mengandung saponin yang berkhasiat dalam meningkatkan sistem kekebalan tubuh dan mampu menginduksi produksi sitokin namun secara analisa statistik tidak ada pengaruh signifikan dari pemberian ekstrak biji alpukat (*P. americana* Mill.) terhadap kadar sitokin IL-10 dalam darah mencit yang diinjeksi bakteri *S. aureus*. Adapun salah satu kemungkinan yang menyebabkan hal tersebut karena pemberian dosis yang kurang sesuai atau kandungan metabolit sekunder yang kurang dari biji yang digunakan dalam penelitian ini sehingga efek yang ditimbulkan juga tidak maksimal. Seperti penjelasan Dabas *et.al*, (2013) bahwa jumlah senyawa dalam biji alpukat (*P.*

Americana Mill.) bervariasi tergantung pada varietas alpukat, kondisi pertumbuhan dan tahap pematangan buah. Selain itu jumlah yang terukur dapat juga dipengaruhi oleh jenis sampel, metode ekstraksi dan teknik yang digunakan dalam penelitian.

Selain itu juga ada beberapa hal terkait dengan sitokin itu sendiri yang menyebabkan ekspresi IL-10 pada hari ke-7 setelah pemberian terapi tidak ada pengaruh yang signifikan. Diduga disebabkan karena ciri-ciri dari sitokin itu sendiri salah satunya adalah disekresikan dalam waktu yang singkat, sedangkan dalam penelitian ini dilakukan pengukuran kadar sitokin IL-10 hanya satu kali saja yaitu 7 hari setelah pemberian terapi ekstrak biji alpukat (*P. americana* Mill.) dan tidak dilakukan pengukuran sebelumnya atau setelah pemberian terapi setiap harinya, sehingga tidak ada perbandingan. Seperti dalam penelitian tesis oleh Tahir (2013) dilakukan pengukuran kadar IL-10 dalam waktu 2 jam dan 24 jam setelah dilakukan pembedahan. Selain itu juga dilakukan pengukuran kadar sitokin IL-10 sebelum adanya perlakuan sehingga dapat dijadikan sebagai perbandingan. Dalam penelitian Margono (2016) juga dilakukan pengukuran kadar sitokin IL-10 dalam waktu 3 jam dan 5 hari setelah pemberian terapi. Dalam penelitian tersebut juga tidak diperoleh pengaruh yang signifikan dari pemberian terapi terhadap kadar IL-10, namun dengan dilakukannya pengukuran kadar sitokin IL-10 dalam waktu 3 jam dapat diketahui bahwa kadar sitokin justru menurun pada hari ke-5.

Baratawidjaja (2014) menjelaskan bahwa sekresi sitokin terjadi sangat cepat dan hanya sebentar, tidak disimpan sebagai molekul pleiotropik (satu sitokin

bekerja terhadap berbagai jenis sel yang menimbulkan berbagai efek) dan redundan (berbagai sitokin menunjukkan efek yang sama). Oleh karena itu efek anatagonis satu sitokin tidak akan menunjukkan hasil nyata karena ada kompensasi dari sitokin lain yang juga disekresikan dalam waktu bersamaan.

Adapun dugaan lain adalah dalam penelitian ini hanya dilakukan pengukuran satu jenis sitokin yaitu IL-10 saja. Padahal dalam suatu respon imun ada beberapa sitokin yang memiliki fungsi sama dan disekresikan dalam waktu bersamaan sebagai respon imun terhadap adanya antigen. Baratawidjaja (2014) menjelaskan bahwa sifat umum sitokin dapat memberikan efek langsung maupun tidak langsung. Efek langsung berupa lebih dari satu efek terhadap berbagai jenis sel (pleiotropi), autoregulasi (fungsi autokrin), efek terhadap sel yang letaknya tidak jauh (fungsi parakrin). Sedangkan efek tidak langsung dari sitokin diantaranya menginduksi ekspresi reseptor untuk sitokin lain atau bekerja sama dengan sitokin lain dalam merangsang sel (sinergisme), dan efek mencegah ekspresi reseptor atau produksi sitokin (antagonisme).

Seperti dalam penelitian tesis oleh Tahir (2013) dilakukan pengukuran kadar sitokin IL-6 dan IL-10 yang kemudian dibandingkan rasio antar keduanya. Dilakukan pengukuran kadar sitokin IL-6 untuk mengetahui perbandingan respon inflamasi karena adanya perlakuan pembedahan. Hudspith (2003) dalam Tahir (2013) menjelaskan bahwa sitokin proinflamasi IL-6 adalah mediator yang menduduki porsi terbanyak dalam respon fase protein akut terhadap kerusakan jaringan akibat pembedahan. Sitokin IL-10 telah terbukti menghambat sintesis IL-

6 dan IL-8 oleh monosit. Dari penelitian tersebut menunjukkan bahwa IL-10 bertindak sebagai antagonis alami dari sitokin proinflamasi.

Pengukuran kadar sitokin IL-10 dalam penelitian ini menggunakan sampel darah mencit yang kemudian diambil serumnya. Hal ini terkait dengan efek tidak langsung dari sitokin itu sendiri yaitu bersifat antagonis. Baratawidjaja (2014) menjelaskan bahwa sejumlah protein mencegah aktivitas biologis sitokin. Protein tersebut berikatan langsung dengan reseptor sitokin tetapi tidak dapat mengaktifkan sel, atau berikatan langsung dengan sitokin yang mencegah aktivitasnya. Contoh yang menghambat adalah antagonis IL-IR (IL-IRa) yang berikatan IL-IR tetapi tidak memiliki aktivitas. Produksi IL-IRa diduga berperan dalam regulasi respons intensitas inflamasi. Adapun inhibitor sitokin ditemukan dalam darah dan cairan ekstraseluler.

Beberapa virus dan mikroba dapat mengembangkan strategi untuk menghindari adanya aktivitas sitokin. Strategi antisitokin tersebut merupakan bukti biologis pentingnya sitokin dalam menimbulkan respon imun yang efektif terhadap mikroba. Baratawidjaja (2014) menjelaskan bahwa *Epstein Barr Virus* (EBV) memproduksi molekul serupa dengan IL-10 (vIL-10) yang mengikat reseptor IL-10R dan seperti IL-10 selular menekan respon Th1 yang efektif terhadap virus dan parasit intraseluler. Molekul yang diproduksi oleh virus atau mikroba yang menyerupai sitokin memungkinkan virus atau mikroba dapat memanipulasi respons imun yang membantu masa hidup patogen tersebut.

Adapun pada kasus infeksi dalam penelitian ini bakteri *S. aureus* yang diinjeksikan tidak menyebabkan kerusakan yang berarti pada jaringan sehingga

infeksi yang terjadi tidaklah termasuk dalam infeksi akut. Atau juga dapat disebabkan bakteri *S.aureus* mampu melakukan penghindaran terhadap sel imun. Charles (2010) menjelaskan bahwa Respon patogen dalam menghadapi sistem kekebalan juga berlainan. Selain dengan berbagai cara untuk menghindar, beberapa patogen melakukan perlawanan. Bakteri *S. aureus* melepaskan dua macam toksin yaitu *staphylococcal enterotoxin* dan *toxic shock syndrome toxin-1* yang berperan sebagai superantigen. Superantigen adalah protein yang mengikat sejumlah penyerap antigen dari sel T. ikatan ini menyebabkan sel T mengalami apoptosis dengan cepat.

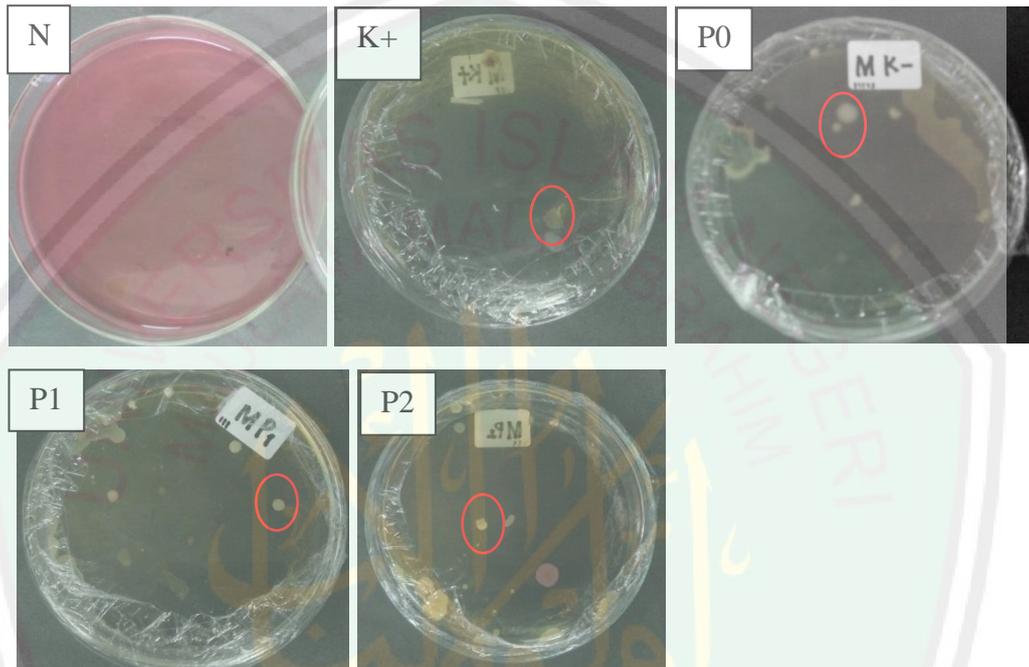


4.2 Pengaruh Ekstrak Etanol Biji Alpukat (*Persea americana* Mill.) terhadap Jumlah Bakteri *Staphylococcus aureus* dalam Darah

Pengujian kedua ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh ekstrak biji alpukat (*Persea americana* Mill.) terhadap jumlah bakteri *Staphylococcus aureus* dalam darah mencit yang sebelumnya telah diinfeksi *S. aureus*. Infeksi yang disebabkan oleh *S. aureus* dapat menyebabkan penyakit yang cukup kompleks hingga dapat mengganggu semua sistem organ. Bakteri *S. aureus* adalah salah satu penyebab paling umum *bacteremia* (kondisi dimana bakteri hadir dalam aliran darah dan terkait penyebab sepsis) dengan tingkat kematian lebih tinggi dibandingkan dengan bakteri lain (Melzer, 2013). Adapun untuk memastikan adanya infeksi bakteri dalam tubuh maka salah satu cara untuk mengetahuinya adalah dengan melakukan pemeriksaan jumlah koloni bakteri yang ada dalam darah secara *in vivo*.

Penelitian ini menggunakan 5 perlakuan yaitu: (1) Normal (mencit jantan normal, tanpa infeksi *S. aureus* dan tanpa pengobatan); (2) Kontrol positif (mencit jantan normal, diinfeksi *S. aureus* dan diberi antibiotik helixim); (3) P0/kontrol negatif (mencit jantan normal, diinfeksi *S. aureus* tanpa pengobatan); (4) Perlakuan 1 (mencit jantan normal yang diinfeksi *S. aureus* dan diberi ekstrak biji alpukat dengan dosis 600 mg/kg); dan (5) Perlakuan 2 (mencit jantan normal yang diinfeksi *S. aureus* dan diberi ekstrak biji alpukat dengan dosis 1200 mg/kg). Injeksi bakteri *S. aureus* sebanyak 1×10^8 sel/ml (Nakamura dkk., 2013). Masa inkubasi *S. aureus* adalah 2x24 jam (Kobayashi dkk., 2015), sehingga dilakukan uji konfirmasi keberadaan bakteri dalam tubuh mencit pada hari kedua setelah injeksi.

Uji konfirmasi yang pertama bertujuan untuk mengetahui ada tidaknya bakteri dari genus *Staphylococcus* khususnya *S. aureus*. Uji konfirmasi ini dilakukan dengan cara mengambil darah mencit dan menginokulasikannya pada media media selektif MSA (*Mannitol Salt Agar*).



Gambar 4.2. Hasil uji konfirmasi keberadaan *S. aureus* dalam darah mencit setelah diinjeksi *S. aureus* (sebelum Perlakuan) (koloni ditunjukkan tanda ●)

Keterangan:

N : Normal

K+ : Kontrol positif (kontrol obat)

P0 : Kontrol negatif/perlakuan dosis 0 mg/kg BB

P1 : Perlakuan dosis 600 mg/kg BB

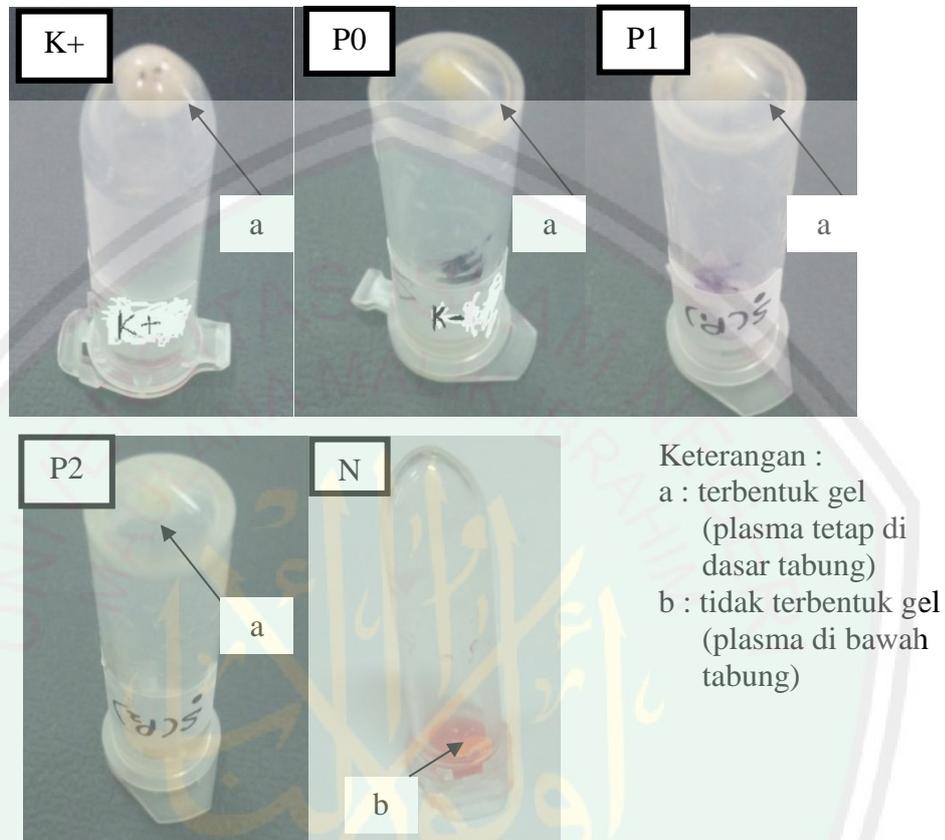
P2 : Perlakuan dosis 1200 mg/kg BB

Hasil uji konfirmasi ini menunjukkan hasil positif pada K+ (kontrol positif), P0 (kontrol negatif), P1 (perlakuan dosis 600 mg/kg BB) dan P2 (perlakuan dosis 1200 mg/kg BB). Sedangkan uji konfirmasi untuk perlakuan normal menunjukkan hasil negatif. Hasil positif ditandai dengan perubahan warna media yang semula merah menjadi kuning keemasan dengan bentuk koloni bulat sedangkan pada perlakuan normal (hasil negatif) media MSA tetap berwarna merah dan tidak ada koloni bakteri yang tumbuh (Gambar 4.1). Todar (2002) dalam Dewi dkk. (2013) menyatakan bahwa koloni *S. aureus* berbentuk bundar, halus, menonjol dan berkilau. *S. aureus* mempunyai pigmen *lipochrom* yang menyebabkan koloninya tampak berwarna kuning keemasan dan adanya pigmen tersebut dapat membedakannya dengan koloni *S. epidermidis* yang berwarna putih.

Hasil uji konfirmasi tersebut dilanjutkan dengan uji koagulase yang bertujuan untuk memastikan bahwa bakteri yang telah menginfeksi mencit adalah spesies *S. aureus*. Produksi koagulase adalah kriteria yang paling umum digunakan untuk identifikasi *S. aureus* karena kemampuannya menghasilkan enzim koagulase (Abrar, 2001 dalam Dewi dkk., 2013). Uji koagulase dilakukan dengan cara mengambil koloni bakteri *S. aureus* (dari hasil uji konfirmasi pertama) dan diinokulasikan pada plasma.

Hasil uji koagulase pada penelitian ini positif pada kontrol positif, P0 (kontrol negatif), P1 (perlakuan dosis 600 mg/kg BB) dan P2 (perlakuan dosis 1200 mg/kg BB). Adapun hasil positif ditunjukkan dengan adanya pembekuan plasma sehingga terbentuk gel yang tetap berada di dasar tabung saat dimiringkan

(Gambar 4.2). Reaksi koagulase positif ini membedakan *S. aureus* dengan *S. epidermidis* dan *S. saprophyticus* (Bruckler dkk., 1994 dalam Dewi dkk., 2013).



Gambar 4.3. Hasil Uji Koagulase

Keterangan:

N : Normal

K+ : Kontrol positif (kontrol obat)

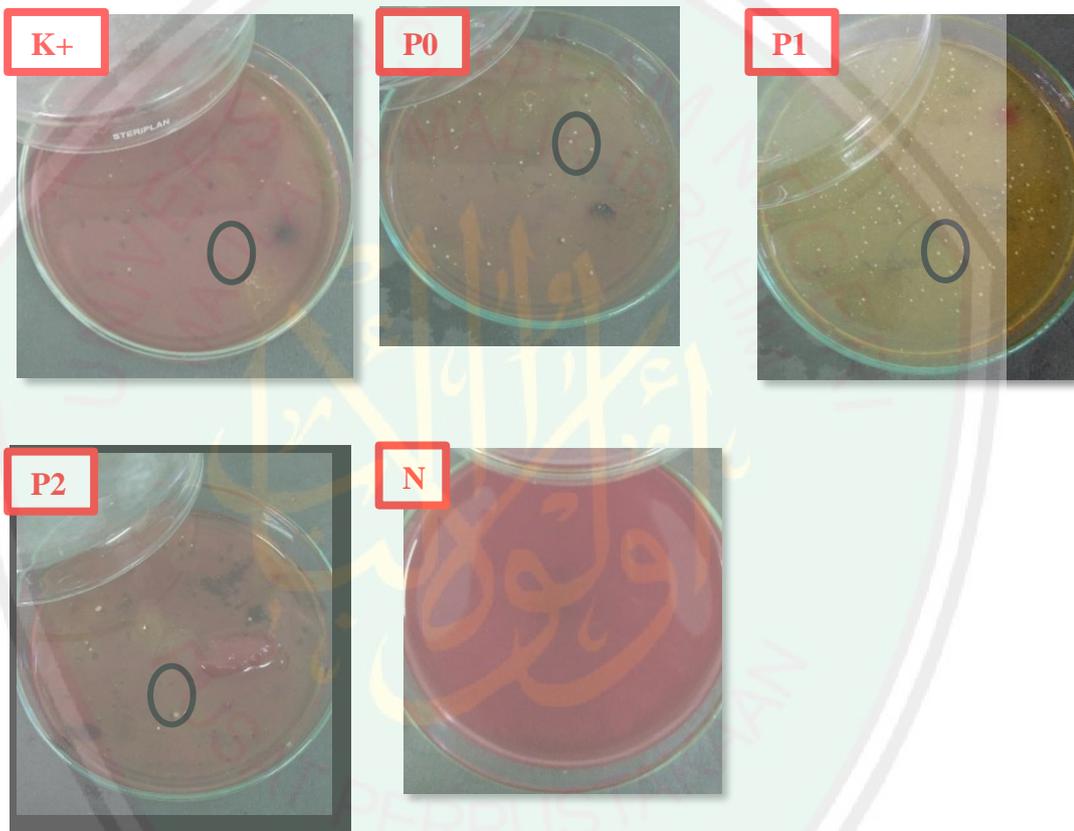
P0 : Kontrol negatif/perlakuan dosis 0 mg/kg BB

P1 : Perlakuan dosis 600 mg/kg BB

P2 : Perlakuan dosis 1200 mg/kg BB

Penelitian ini kemudian dilanjutkan dengan pemberian terapi ekstrak etanol biji alpukat (*P. americana* Mill.) setelah muncul tanda-tanda infeksi yakni pada hari ketiga serta berdasarkan hasil uji konfirmasi yang menunjukkan bahwa bakteri *S. aureus* telah berada dalam tubuh mencit. Pemberian ekstrak etanol biji alpukat (*P. americana* Mill.) ini secara intraperitoneal selama 7 hari. Selanjutnya

dilakukan pembedahan pada hari kedelapan dilakukan uji konfirmasi kedua dengan mengambil sampel darah mencit untuk mengetahui pengaruh ekstrak biji alpukat (*Persea americana* Mill.) terhadap jumlah bakteri *Staphylococcus aureus* dalam darah mencit.



Gambar 4.4. Hasil Pertumbuhan Bakteri *S. aureus* pada Media MSA setelah Perlakuan (koloni ditunjukkan tanda **O**)

Keterangan:

- N : Normal
- K+ : Kontrol positif (kontrol obat)
- P0 : Kontrol negatif/perlakuan dosis 0 mg/kg BB
- P1 : Perlakuan dosis 600 mg/kg BB
- P2 : Perlakuan dosis 1200 mg/kg BB

Hasil pengujian tersebut menunjukkan bahwa pada perlakuan normal tidak ada satupun koloni bakteri *S. aureus* yang tumbuh pada media agar MSA dan terdapat adanya pertumbuhan bakteri *S. aureus* pada perlakuan K+;P0;P1;P2 (gambar 4.3). Pada perlakuan kontrol positif (K+) menunjukkan adanya pertumbuhan koloni bakteri *S. aureus* yang berturut-turut dari ulangan pertama hingga kelima sebanyak 2;5;18;10;11 koloni dan diperoleh nilai rata-rata sebesar 9,2. Untuk perlakuan kontrol negatif atau dosis 0 mg/kg BB (P0) jumlah bakteri yang tumbuh sebanyak 0;50;86;26;33 koloni dengan nilai rata-rata sebesar 39. Untuk perlakuan dosis 600 mg/kg BB (P1) jumlah bakteri yang tumbuh sebanyak 20;12;18;32;0 koloni dengan nilai rata-rata sebesar 16,4. Dan untuk perlakuan dosis 1200 mg/kg BB (P2) jumlah bakteri yang tumbuh sebanyak 15;7;6;16;15 koloni dengan nilai rata-rata sebesar 11,8. (Tabel 4.2)

Banyaknya jumlah koloni bakteri dalam darah menunjukkan adanya kondisi yang tidak sehat dalam tubuh karena keberadaan bakteri dapat menimbulkan infeksi dan penyakit sepsis. Dalam penelitian ini digunakan ekstrak biji alpukat (*P. americana* Mill.) yang digunakan sebagai terapi obat yang berfungsi untuk penyembuhan. Dapat dilihat dari hasil penelitian bahwa dengan diberi terapi ekstrak dengan dosis 1200 mg/kg BB jumlah koloni bakteri dalam darah lebih sedikit dari pada sebelum dilakukan perlakuan atau pada uji konfirmasi. Hal tersebut menunjukkan adanya perbedaan jumlah koloni bakteri dalam darah yang semakin sedikit yang dapat berarti ada proses penyembuhan.

Selain bentuk ikhtiyar manusia dalam hal mencari dan mempelajari penyembuhan penyakit dengan berbagai terapi dan obat, sesungguhnya Allah SWT telah menjamin kesembuhan suatu penyakit sebagaimana firman-Nya dalam al-Quran surat Asy-Syuara' (26) ayat 80:

وَإِذَا مَرِضْتُ فَهُوَ يَشْفِينِ ﴿٨٠﴾

“Dan apabila aku sakit, Dialah yang menyembuhkanku.” (Q.S. Asy- Syuara' (26): 80)

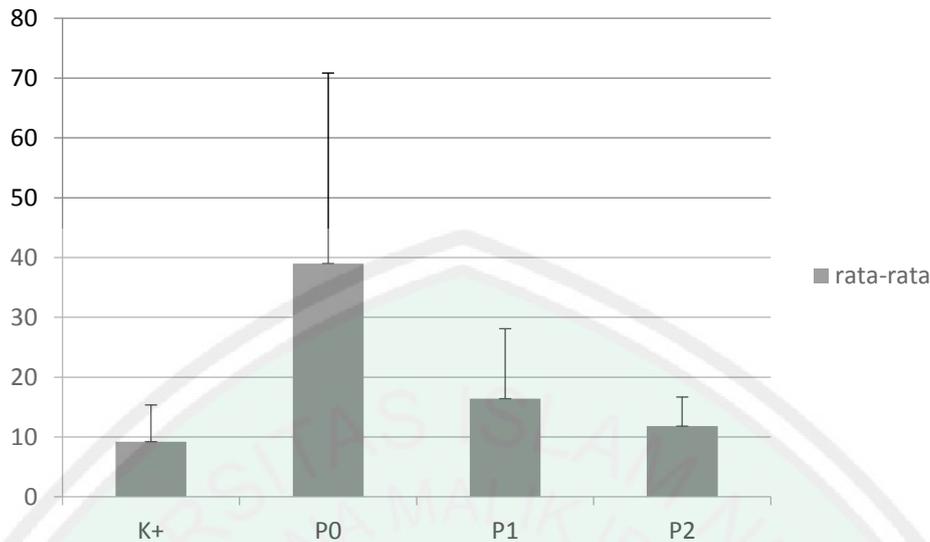
Kata “إِذَا”(apabila) mempunyai makna kemungkinan atau kepastian, sedangkan kata “مَرِضْتُ” (aku sakit) bermakna disandarkan penyakit kepada diri sendiri, dan kata “هُوَ” (Dialah) bermakna disandarkan kepada Pencipta, sehingga kalimat “dan apabila aku sakit, Dialah yang menyembuhkan aku” yaitu besar kemungkinan kesembuhan penyakit bersumber pada Allah SWT (Shihab, 2002). Allah SWT telah memberi petunjuk untuk penyembuhan suatu penyakit yang berasal dari hasil ciptaan-Nya agar dapat dimanfaatkan sebagai obat. Salah satu contohnya adalah pemanfaatan biji alpukat (*P. americana* Mill.) untuk mengatasi penyakit infeksi akibat *S. aureus* seperti yang digunakan dalam penelitian ini.

Tabel 4.2. Hasil Perhitungan Rata-Rata Jumlah Bakteri *S.aureus* dalam Darah dan Standar Deviasi

Perlakuan	Rata-rata ± Standart Deviasi
Normal	0
Kontrol +	9,2 ± 6,14
P0 (dosis 0 mg/kg BB)	48,75 ± 20,80
P1 (dosis 600 mg/kg BB)	20,5 ± 8,39
P2 (dosis 1200 mg/kg BB)	11,8 ± 4,87

Keterangan:

- Nilai rata-rata jumlah bakteri *S.aureus* dalam darah dinyatakan dengan satuan cfu



Gambar 4.5 Diagram Rata-Rata Jumlah Koloni Bakteri *S. aureus* dalam Darah

Keterangan:

- K+ : Kontrol positif (kontrol obat)
- P0 : Kontrol negatif/perlakuan dosis 0 mg/kg BB
- P1 : Perlakuan dosis 600 mg/kg BB
- P2 : Perlakuan dosis 1200 mg/kg BB

Data tersebut kemudian dianalisis statistik menggunakan *SPSS 16.0 for Windows*. Hasil uji normalitas dengan *Kolmogorov-Smirnov* menunjukkan bahwa data terdistribusi normal karena memiliki nilai signifikansi sebesar 0,232 ($p > 0,05$). Hasil uji homogenitas pada *Levene test* memiliki nilai signifikansi sebesar 0,028 ($p < 0,05$), sehingga dapat disimpulkan bahwa jumlah koloni bakteri yang tumbuh pada semua perlakuan memiliki variansi yang tidak sama pada tiap perlakuan (tidak homogen) (lampiran 4). Hal ini menyebabkan jumlah koloni bakteri *S. aureus* pada tiap ulangan memiliki rentang yang tinggi. Adapun penyebab lain yang mungkin terjadi terkait dengan teknik perlakuan ketika injeksi bakteri maupun ketika pemberian ekstrak per oral dengan sonde lambung. Hewan

coba yang digunakan aktif bergerak sehingga volume ekstrak maupun bakteri yang diinjeksikan tidak dapat masuk seluruhnya ke dalam tubuh hewan coba.

Singh (2015) menyatakan bahwa jika data normal, namun tidak homogen maka diuji dengan uji F, salah satu contohnya dengan uji *Welch* yang dilanjutkan dengan uji *Games-Howell* jika hasilnya signifikan. Hasil uji *Welch* menunjukkan signifikansi sebesar 0,279 ($p > 0,05$) sehingga dapat disimpulkan bahwa hipotesa 1 (H1) ditolak dan hipotesa 0 (H0) diterima. Hal ini menunjukkan bahwa pemberian ekstrak biji alpukat (*P. americana* Mill.) secara signifikan tidak berpengaruh terhadap jumlah koloni bakteri *S. aureus* dalam darah mencit untuk semua perlakuan.

Tabel 4.3 Hasil Uji Lanjut *Games-Howell*

Perlakuan	P0	P1	P2	K+
P0		0,505	0,354	0,298
P1			0,847	0,638
P2				0,877
K+				

$p > 0,005$ = tidak signifikan dan $p < 0,005$ = signifikan

Keterangan:

- K+ : Kontrol positif (kontrol obat)
- P0 : Kontrol negatif/perlakuan dosis 0 mg/kg BB
- P1 : Perlakuan dosis 600 mg/kg BB
- P2 : Perlakuan dosis 1200 mg/kg BB

Hasil uji *Games-Howell* pada semua perlakuan menunjukkan hasil tidak signifikan. Pemberian terapi ekstrak biji alpukat (*P. americana* Mill.) yang tidak berpengaruh terhadap semua perlakuan berdasarkan hasil analisa *SPSS* kemungkinan dapat disebabkan karena adanya data yang tidak homogen serta perubahan kondisi lingkungan untuk pertumbuhan bakteri *S. aureus* yang berawal pada biakan murni kemudian pada tubuh mencit sebagai inang dan kemudian pada media agar MSA.

Dalam pengujian ini dapat diketahui bahwa injeksi yang dilakukan telah berhasil. Hal tersebut terbukti dari uji konfirmasi yang menunjukkan hasil positif. Adapun berdasarkan hasil jumlah koloni bakteri setelah diberi perlakuan khususnya pemberian terapi ekstrak biji alpukat (*P.americana* Mill.) yaitu P1 dan P2 rata-rata jumlah koloni bakteri mendekati dengan hasil perlakuan terapi antibiotik (K+). Artinya pemberian terapi ekstrak tersebut sudah memberikan efek meskipun secara analisa statistik hasil tersebut tidak signifikan. Secara teori senyawa aktif yang terkandung dalam ekstrak biji alpukat (*P. americana* Mill.) memiliki efek sebagai antibakteri. Seperti yang dijelaskan Dewi dan Sulistyowati (2013) ekstrak biji alpukat (*P. americana* Mill.) berpotensi sebagai antibakteri yang bekerja spesifik dalam merusak dan mengganggu permeabilitas dinding sel bakteri.

Kandungan metabolit sekunder pada biji alpukat yang berpotensi sebagai antibakteri seperti halnya alkaloid, flavonoid, saponin, fenol dan tanin. Menurut Wink dkk (1998), senyawa-senyawa golongan alkaloid dapat menghambat DNA polimerase dan juga mampu menghambat biosintesis protein pada proses translasi. Robinson (1995) menyatakan bahwa alkaloid dapat mengganggu terbentuknya komponen penyusun peptidoglikan pada sel bakteri, sehingga lapisan dinding sel tidak terbentuk secara utuh dan menyebabkan kematian pada bakteri. Flavonoid juga berkhasiat sebagai antibakteri dengan cara membentuk kompleks dengan protein ekstraseluler yang terdapat pada dinding sel bakteri, dimungkinkan hal tersebut menyebabkan rigiditas dari dinding sel mengalami penurunan, sehingga mengakibatkan flavonoid mampu menerobos dinding sel. Selain itu, flavonoid

yang bersifat lipofilik dapat menerobos membran sel bakteri, mengurangi fluiditas dari membran sel, kemudian mendenaturasi protein yang menyebabkan aktivitas metabolisme bakteri terhenti (Novalina dkk., 2013).

Setiap sel bakteri dikelilingi membran sitoplasma yang tersusun dominan oleh ergosterol yang bersifat permeabel selektif. Selain itu, fosfolipid juga merupakan senyawa yang penting dalam pembentukan membran sitoplasma bakteri. Mekanisme kerusakan membran sitoplasma oleh senyawa saponin (polifenol) menurut Dewi (2013) dilakukan dengan cara melepaskan ion H^+ yang selanjutnya menyerang gugus hidrofilik (gugus hidroksi dan fosfat) pada permukaan membran sel, mengakibatkan gugus hidroksi pada molekul ergosterol berikatan dengan hidrogen terputus, sehingga membran sel tidak mampu menahan tekanan dari dalam, akibatnya sitoplasma dalam sel akan menembus keluar. Molekul fosfolipid ion H^+ dari senyawa saponin akan menyerang gugus polar (gugus fosfat) sehingga molekul fosfolipid akan terurai menjadi gliserol, asam karboksilat, dan asam fosfat. Hal ini mengakibatkan fosfolipid tidak mampu mempertahankan bentuk membran sitoplasma dan mengakibatkan membran sitoplasma bocor sehingga zat-zat untuk metabolisme sel bakteri akan terbuang keluar dan bakteri akan mati

Senyawa fenolik juga berperan menurunkan tegangan permukaan sel mikroba. Prindle (1983) menjelaskan bahwa gugus OH dari fenol dapat bersifat racun bagi protoplasma sel, dapat menembus dan merusak dinding sel serta mendenaturasi protein enzim dalam sitoplasma dengan membentuk ikatan hidrogen pada sisi aktif enzim. Adapun mekanisme antibakteri pada fenolik

yaitu penghambatan enzim oleh senyawa teroksidasi, melalui reaksi dengan sulfhidril atau melalui interaksi nonspesifik dengan protein (Cowan, 1999). Sedangkan senyawa tanin yang berkhasiat sebagai antibakteri mampu menghambat pertumbuhan bakteri dengan cara mengkoagulasi protoplasma bakteri. Mekanisme penghambatan tannin yaitu dengan cara dinding bakteri yang telah lisis akibat senyawa saponin dan flavonoid, sehingga menyebabkan senyawa tannin dapat dengan mudah masuk ke dalam sel bakteri dan mengkoagulasi protoplasma sel (Pratiwi, 2008 dalam Karlina, 2013).

Adanya kandungan metabolit sekunder pada ekstrak biji alpukat (*P. americana* Mill.) tersebut seharusnya memiliki khasiat dalam menghambat pertumbuhan bakteri *S. aureus* dalam darah. Meskipun berdasarkan hasil uji SPSS hasilnya tidak signifikan, namun apabila hasil perhitungan jumlah bakteri *S. aureus* dalam darah apabila diamati secara langsung dari jumlah rata-rata menunjukkan hasil yang berbeda dari setiap perlakuan (Lampiran 3). Jika dibandingkan antara P1 (perlakuan dosis 600 mg/kg BB) dengan P2 (perlakuan dosis 1200 mg/kg BB) jumlah bakteri *S. aureus* dalam darah lebih banyak P1 daripada P2. Hal tersebut menunjukkan bahwa dengan dosis ekstrak biji alpukat (*P. americana* Mill.) yang lebih tinggi maka keberadaan bakteri *S. aureus* dalam darah semakin rendah. Apabila dibandingkan antara P2 (perlakuan dosis 1200 mg/kg BB) dengan kontrol + (perlakuan terapi antibiotik helixim) jumlah rata-rata bakteri *S. aureus* dalam darah tidak memiliki jarak yang terlalu tinggi.

Penggunaan antibiotik jenis helixim sebagai kontrol + dalam penelitian ini bertujuan untuk membandingkannya dengan terapi alami yang berasal dari ekstrak

biji alpukat (*P. americana* Mill.). Helixim merupakan jenis antibiotik cefixime. Adapun keberhasilan pengobatan antibiotik ditentukan oleh interaksi obat dengan reseptor yang terdapat dalam mikroorganisme. Ketika terjadi ikatan antara mikroorganisme dengan obat, maka daya toksik yang dimiliki obat tersebut mampu menghancurkan mikroorganisme (Bhutta, 1997). Penelitian Kusuma (2017), melaporkan bahwa cefixime berperan sebagai antibakteri yang mengandung senyawa rutin untuk menghambat dihidrofolat reduktase yang diproduksi oleh *S. aureus* karena berpotensi berikatan dengan reseptor PBP2a pada dinding sel *S. aureus* Oefner dkk. (2009) menjelaskan bahwa enzim dihidrofolat reduktase berfungsi untuk mengkatalis reaksi pembentukan tetrahidrofolat dari asam folat. Penghambatan enzim dihidrofolat reduktase ini dapat menyebabkan sintesis DNA dan pembelahan sel terhambat sehingga dapat menyebabkan kematian sel.

Berdasarkan hasil dari perlakuan P2 dan K+ tersebut, perbedaan jumlah bakteri *S. aureus* dalam darah diduga karena terapi yang diberikan dari masing-masing bahan baik dari antibiotik maupun dari ekstrak biji alpukat (*P. americana* Mill.) memiliki senyawa aktif dengan mekanisme tersendiri yang berperan dalam menangani keberadaan bakteri dalam darah yang terkait dengan penyakit sepsis. Adapun penyakit yang timbul akibat infeksi *S. aureus* cukup kompleks hingga dapat mengakibatkan gangguan pada semua sistem organ. Melzer (2013) menjelaskan bahwa bakteri *S. aureus* adalah salah satu penyebab paling umum *bacteremia* (kondisi dimana bakteri hadir dalam aliran darah dan terkait penyebab sepsis) dengan tingkat kematian lebih tinggi dibandingkan dengan bakteri lain.

Adanya suatu jenis penyakit seperti halnya sepsis yang terkait dengan adanya bakteri dalam darah tentu sebenarnya terdapat obat yang dapat menyembuhkannya. Obat merupakan senyawa kimia yang mempunyai dua sifat berlawanan yaitu jika jumlahnya sesuai maka akan menimbulkan efek penyembuhan, namun jika jumlahnya berlebihan atau melebihi takaran dosis maka dapat bersifat toksik yang justru berbahaya apabila dikonsumsi. Berdasarkan hal tersebut maka penggunaan obat harus sesuai dengan ukuran atau dosis tertentu agar tidak membahayakan tubuh. Sebagaimana yang telah Allah SWT jelaskan dalam al-Quran surat Al-Qomar (54) ayat 49 sebagai berikut:

إِنَّا كُلَّ شَيْءٍ خَلَقْنَاهُ بِقَدَرٍ ﴿٤٩﴾

“*Sesungguhnya Kami menciptakan segala sesuatu menurut ukuran*” (QS. Al-Qomar: 49).

Kata *قَدَرٍ* pada ayat 49 surat Al-Qomar memiliki arti ukuran, dan dijelaskan bahwa Allah SWT telah menciptakan sesuatu menurut ukuran yang terbatas dan tidak berlebihan (Shihab, 2002). Hal tersebut juga dapat diartikan sebagai takaran atau dosis yang berhubungan dengan obat. Pada penelitian ini ditunjukkan dengan hasil percobaan bahwa pemberian ekstrak etanol biji alpukat (*P. americana* Mill.) dengan perlakuan P1 (dosis 600 mg/kg BB) berbeda dengan perlakuan P2 (dosis 1200 mg/kg BB) sehingga dapat disimpulkan bahwa dengan menggunakan dosis yang berbeda maka efek dari ekstrak etanol biji alpukat (*P. americana* Mill.) juga dapat menimbulkan perbedaan jumlah bakteri *S. aureus* dalam darah pada setiap perlakuan.

BAB V

PENUTUP

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian, dapat disimpulkan beberapa hal sebagai berikut:

1. Ekstrak etanol biji alpukat (*P. americana* Mill.) tidak berpengaruh terhadap jumlah koloni bakteri di dalam darah.
2. Ekstrak etanol biji alpukat (*P. americana* Mill.) tidak berpengaruh terhadap kadar sitokin IL-10

5.2 Saran

Berdasarkan hasil penelitian, dapat dikemukakan beberapa saran sebagai berikut:

1. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut dengan dosis ekstrak biji alpukat (*P. americana* Mill.) yang lebih bervariasi sehingga dapat diperoleh dosis ekstrak biji alpukat yang lebih berpengaruh terhadap jumlah koloni bakteri dalam darah dan kadar sitokin IL-10 pada mencit yang diinfeksi bakteri *S. aureus*.
2. Sebaiknya untuk penelitian selanjutnya juga dilakukan pengukuran kadar sitokin IL-10 sebelum perlakuan injeksi bakteri *S. Aureus* sehingga dapat digunakan sebagai pembanding antara sebelum perlakuan dan setelah perlakuan, atau dilakukan pengukuran sitokin lain yang sinergis dengan IL-10.

DAFTAR PUSTAKA

- Abadallah, Marwa, Zaki S. M. I., Sayed A., dan Erfan D. 2007. Evaluation of Secondary Bacterial Infection of Skin Diseases in Egyptian in and Outpatients and Their Sensitivity to Antimicrobials. *Egyptian Dermatology Online Journal*. Vol. 3. No. 2.
- Abbas, A.K., Lichtman, A.H. & Pober, J.S. 2007. *Cellular and Molecular Immunology*. Amerika Serikat: W.B. Saunders Company.
- Afifurrahman, K. Husni S., Syahril A. 2014. Pola Kepekaan Bakteri *Staphylococcus aureus* terhadap Antibiotik Vancomycin di RSUP Dr. Mohammad Hoesin Palembang. *Jurnal MKS*. No.4.
- Afrianti, L, H. 2010. *Macam Buah-Buahan untuk Kesehatan*. Bandung: Alfabeta.
- Aiman bin Abdul Fattah. 2005. *Pengobatan dan Penyembuhan Menurut Wahyu Nabi SAW*. Jakarta: Pustaka As-Sabil.
- Ajizah, 2004. Sensitivitas *Salmonella typhimurium* terhadap ekstrak daun *Psidium guajava*. *Journal Bioscien*. Vol. 1.
- Al-Qurthubi*, Syaikh Imam. 2009. *Tafsir Al-Qurthubi*. Jakarta Selatan: Pustaka Azzam.
- Alsuhendra, Zulhipri, Ridawati, dan E. Lisanti, 2007. Ekstraksi dan Karakteristik Senyawa Fenolik dari Biji Alpukat (*Persea americana* Mill.). *Proseding Seminar Nasional PATPI*. Bandung.
- Arukwe, U dkk. 2012. Chemical Composition of *Persea americana* Leaf, Fruit and Seed. *Journal IJRRAS*. Vol .11. No. 2.
- As-Shiddieqy, Hasbi. 2000. *Tafsir Al-Qur'anul Majid An-Nur, Jilid 2, Cetakan Kedua, Edisi Kedua*. Semarang: Pustaka Rizki Putra.
- Baratawidjaja, Karen Garna & Rengganis Iris. *Imunologi Dasar Edisi ke-11 (Cetakan ke-2)*. Jakarta: Badan Penerbit FK UI.
- Bhutta ZA, Zhan IA, and Molla AM. 1997. Therapy of Multidrug-Resistant Thypoid Fever with Oral Cefixime vs Intravenous Ceftriaxone. *Pediatr Infect Dis Journal*.; 13: 990-4.
- Bien, Justyna., Sokolova O., Bozko P. 2011. Characterization of Virulence Factors of *Staphylococcus aureus*: Novel Function of Known Virulence Factors That Are Implicated in Activation of Airway Epithelial Proinflammatory Response. *Journal Pathogens*.

- Brooks, Geo F., Janet S. Butel, Stephen A. Morse. 2008. *Mikrobiologi Kedokteran Jawetz, Melnick, & Adelberg (Ed. 23)*. Alih bahasa oleh: Huriawati Hartanto dkk. Jakarta: EGC.
- Chandra, A., Hie, M. I & Verawati. 2013. Pengaruh pH dan Jenis Pelarut pada Perolehan dan Karakterisasi Pati dari Biji Alpukat. *Jurnal Prosding SNTK TOPI*. ISSN. 1907-0500 Pekanbaru: Universitas Katolik Parahyangan.
- Charles, A. *Janeway, et al.* 2010. Failures of Host Defense Mechanisms. *Immunobiology Chapter 11*.
- Couper, Kevin N dkk. 2008. IL-10: The Master Regulator of Immunity to Infection. *The Journal of Immunology*. ISSN: 1550-6606.
- Cowan. 1999. *Plant Product as Antimicrobial. Clinical Microbiology Review*. Vol. 2 No. 4.
- Crowther, J.R., 2001. *The ELISA Guide Book Methods in Molecular Biology*. The International Atomic Energy Agency. Vienna Austria: Humana Press Inc Totawa, New Jersey.
- Dabas, D., Elias, J.R., Lamebrt, D. J. and Ziegler, R. G. 2011. A Colored Avocado Seed Extract as A Potential Natural Colorant. *Journal of Food Science*. Vol. 76.
- Daintith, J. 1994. *Kamus Lengkap Kimia. Terjemahan Suminar Achmadi*. Jakarta: Erlangga.
- Dalter, A.M. 2003. From medical herbalism to phytotherapy in dermatology: back to the future. *Dermatologic Therapy*. Vol. 16.106–113.
- Darmadi. 2008. *Infeksi Nosokomial Problematika dan Pengendalian*. Jakarta: Salemba Medika.
- Depkes RI. 1995. *Materia Medika Indonesia Jilid VI*. Jakarta: Departemen Kesehatan RI dan Kesejahteraan Sosial RI Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan.
- Depkes RI. 2000. *Inventaris Tanaman Obat Indonesia Jilid II*. Jakarta: Departemen Kesehatan RI dan Kesejahteraan Sosial RI Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan.
- Dewi, Amalia Krishna. 2013. Isolasi, Identifikasi dan Uji Sensitivitas *Staphylococcus aureus* terhadap *Amoxicillin* dari Sampel Susu Kambing Peranakan Ettawa (PE) Penderita Mastitis Di Wilayah Girimulyo, Kulonprogo, Yogyakarta. *Jurnal Sains Veteriner*. Vol. 31. No. 2.

- Dewi, S.R., dan Sulistrowati. 2013. Penggunaan Ekstrak Biji Buah Alpukat (*Persea americana* Mill.) sebagai Antibakteri *Proteus mirabilis* dan *Aerobacter aerogenes*. *Jurnal Stigma*. Vol. 6. No.2.
- Dwidjoseputro. 1994. *Dasar-dasar Mikrobiologi*. Jakarta: Djambatan.
- Dwidjoseputro. 1988. *Dasar-dasar Mikrobiologi*. Jakarta: Djambatan.
- Elabscience. 2015. *Mouse IL-10 (Interleukin 10) ELISA Kit*. Catalog No: E-EL-M0046. www.elabscience.com. (diakses pada tanggal 9 Februari 2017).
- Faizah, Nurul., Muhammad Sasmito Djati. 2014. Pengaruh Ekstrak Daun *Elephantopus Scaber* L. dan *Polyscias obtusa* Terhadap Modulasi Sel T CD8+ dan CD8+CD62L+ Mencit Balb/c. *Jurnal Biotropika*. Vol. 2. No. 3.
- FK UGM. 2014. *Prosedur Bekerja di Ruang Hewan Coba Bagian Farmakologi dan Terapi*. <http://research.fk.ugm.ac.id/index.php/data/laboratorium/48-laboratorium-hewan-coba> (diakses pada tanggal 18 Maret 2017).
- Frodermann, V dkk. 2011. Modulatory Interleukin-10 Response to Staphylococcal Peptidoglycan Prevents Th1/Th17 Adaptive Immunity to *Staphylococcus aureus*. *Journal Infect Dis*. 204, 253–262
- Ghoffar, Abdul dkk. 2007. *Tafsir Ibnu Katsir Jilid 6*. Jakarta: Pustaka Imam as-Syafi'i.
- Glaser, C.A dkk, 2008. The Management of Encephalitis: Clinical Practice Guidelines by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis*.
- Gordon RJ, Franklin DL. 2008. Pathogenesis of *Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus* Infection. *Clin Infect Dis*. Vol. 46. No. 5.
- Guenther, E. 1987. *Minyak Atsiri jilid I (Terjemahan)*. Jakarta: UI Press.
- Hanafiah, K.A. 1993. *Rancangan Percobaan: Teori dan Aplikasi*. Jakarta: PT. Raja Grafindo Persada.
- Harborne. 1987. *Metode Fitokimia, Penuntun Cara Modern Menganalisa Tumbuhan*, Terjemahan oleh: K. Padmawinata. Edisi II. Bandung: ITB Press.
- Harvey, R. A., Champe, P. C., Fisher, B. D. 2007. *Microbiology (2nd Ed.)*. USA: Lippincot Williams & Wilkins.
- Hausmann, M. F., C. M. Vleck, & E. S. Farrar. 2007. A Laboratory Exercise To illustrate Increased Salivary Cortisol in Response to Three Stressful Conditions using Competitive ELISA. *Adv. Physiol. Educ*. 31: 110–115.

- Hermanto, C., Ni Luh P.I., Sri H. 2013. *Keragaman dan Kekayaan Buah Tropika Nusantara*. Jakarta: Badan Litbang Pertanian.
- Horowitz, E. 2005. *Prehehin L. Guidelines for the Control of MRSA*. Oklahoma USA: State Health Departement.
- Hudspith, M., Munglani, R. 2003. *Sites of analgesia*. In: Bountra C, Munglani R, Schmidt WK. Pain current understanding, emerging therapies, and novel approaches to drug discovery. New York: Marcel-Decker Inc. p. 205-34.
- Idris, S., G.I. Ndukwe., C.E. Gimba. 2009. Preliminary Phytochemical Screening and Antrimicrobial Activity of Seed Extract of *Persea Americana* (Avocado Pear). *Journal Bajopas*. Vol. 2. No. 1.
- Ilozue, N.M., Ikezu U.P., Ugwu Okechukwu, P.C. 2014. Anti-Microbial and Phytochemical Screening of the Seed Etract op *Persea americana* (AVOCADO PEAR). *IOSR Journal of Pharmacy and Biological Sciences*. Vol. 9. Issue 2.
- Janeway, C.A., Travers, P., Walport, M., & Sholmchik, M. 2001. *The Immune system in Health and Desease*. Garland Publishing.
- Jawetz dkk. 2005. *Mikrobiologi Kedokteran*. Ed. Alih bahasa oleh Hartanto, dkk Jakarta: EGC.
- Jawetz dkk. 2007. *Mikrobiologi Kedokteran*. Ed. Alih bahasa oleh Hartanto, dkk. Jakarta: EGC.
- Jawetz dkk. 2010. *Mikrobiologi Kedokteran*. Ed. Alih bahasa oleh Hartanto, dkk. Jakarta: EGC.
- Karlina, Chrystie Yudha., Muslimin I., Guntur T. 2013. Aktivitas Antibakteri Ekstrak Herba Krokot (*Portulaca oleracea* L.) terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*. *Lentera Bio*. Vol. 2. No.2
- Katsir Ad-Dimasyqi, Ibnu. 2001. *Tafsir Ibnu Kasir Jilid 3*. Penerjemah Bahrnun Abu Bakar. Bandung: Sinar Baru Algensindo.
- Katsir Ad-Dimasyqi, Ibnu. 2001. *Tafsir Ibnu Kasir Jilid 4*. Penerjemah Bahrnun Abu Bakar. Bandung: Sinar Baru Algensindo.
- Kobayashi, Scott D., Natalia M., Frank R.D. 2015. Pathogenesis of *Staphylococcus aureus* Abscesses. *The American Journal of Pathology*. Vol. 185. No.6.

- Koivunen M.E., Krogsrud R.L. 2006. Principles of Immunochemical Techniques Used in Clinical Laboratories. *Lab Medicine*. Vol. 37. No. 8.
- Kristanti dkk. 2008. *Buku Ajar Fitokimia*. Surabaya: Airlangga University Press.
- Kumar, N dkk. 2011. Isolation and Screening of Soil Actinomycetes as Source of Antibiotics Active Against Bacteria. *International Journal of Microbiology*. Vol. 2. No. 2.
- Kurnianingtyas, E., Muhammad S.D., Muhaimin R. 2013. Aktivitas Immunomodulator *Polyscias obtusa* terhadap Sistem Imunitas pada Bone Marrow Broiler Setelah Pemberian *Salmonella typhimurium*. *J.Exp. Life Sci*. Vol. 3. No. 1.
- Kusuma, Meike Tiya. 2017. Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Biji Alpukat (*Persea americana Mill.*) secara *In Silico* dan Pengaruhnya terhadap Jumlah Sel Fibroblas Jaringan Kulit Mencit (*Mus musculus*) yang Diinfeksi *Staphylococcus aureus*. Skripsi Tidak Diterbitkan. Malang: Jurusan Biologi Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Malang.
- Leech dkk. 2017. IL-10 Plays Opposing Roles during *Staphylococcus aureus* Systemic and Localized Infections. *The Journal of Immunology*. ISSN: 1550-6606.
- Li, Zhigang dkk. 2015. Immunomodulation and Disease Tolerance to *Staphylococcus aureus*. *Journal Pathogens Open Access*. Vol. 4.
- Lianti, 2014. *Khasiat Dahsyat Alpukat Mengobati dan Mencegah Semua Penyakit*. Jakarta: Mahadaya Langit.
- Lim, T.K. 2012. *Edible Medicinal and Non-Medicinal Plants: Fruits Volume 1*. New York: Spinger.
- Mahima dkk. 2013. Immunomodulatory and Therapeutic Potentials of Herbal, Traditional or Indigenous and Ethnoveterinary Medicines. *Pakistan Journal of Biological Science*. Vol. 15. No. 16.
- Malanggi, Liberty P., Meiske S. Sangi., Jessy J. E. Paendong. 2012. Penentuan Kandungan Tanin dan Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Biji Buah Alpukat (*Persea americana Mill.*). *Jurnal Mipa Unsrat Online*. Vol. 1. No. 1.
- Margono, Denny PNH., dkk. 2016. Pengaruh Ekstrak Kelakai (*Stenochlaena palustris (Burm.F) Bedd*) Terhadap Kadar Interleukin-10 (IL-10) Mencit. *Medical Laboratory Technology Journal*. 2 (1), 2016, 31-36.

Reductase are Responsible for The Increase in Affinity and Antibacterial Activity. *Journal Antimicrobial Chemotherapy*. Vol. 63. No. 4.

Parameswaran, I., Vijayalakshmi Krishna Murti. 2014. Comparative study on Physico & Phyto-Chemical analysis of *Persea americana* & *Actinidia deliciosa*. *International Journal of Scientific and Research Publications*. Vol. 4. Issue 5.

Pelczar, M. J. Chan. 2008. *Dasar-dasar Mikrobiologi*. Penerjemah: R.S. Hadioetomo, T. Imas S.S. Tjitrosomo. Jakarta: UI Press.

Prasetyowati., Retno Pratiwi., Fera Tris O. 2010. Pengambilan Minyak Biji Alpukat (*Persea americana* Mill.) dengan Metode Ekstraksi. *Jurnal Teknik Kimia*. No. 2. Vol. 17.

Primadharsini, PP., Wibawa. 2013. Correlation between Quantitative HBsAg and HBV-DNA in Chronic Hepatitis B Infection. *The Indonesian Journal of Gastroenterology, Hepatology and Digestive Endoscopy*. Vol. 14. No. 1.

Prindle, R.F. 1983. *Phenolic compounds: In block ss. Ed Disinfection Sterilization and Preservation*. Philadelphia: Lea and Febiger.

Putera, M. P. A. 2014. Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Buah Pare (*Momordica charantia* Descourt) terhadap Isolat Klinis Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Secara *in Vitro*. *Skripsi*. Universitas Syiah Kuala Aceh.

Putri, Luttpi Widya., Umi Y., Siti H. 2015. Uji Efek Antihiperqlikemia Kombinasi Ekstrak Etanol Daun Alpukat dan Biji Alpukat (*Persea smericana* Mill.) terhadap Mencit JAntan (*Mus musculus*) Swiss Webster yang diinduksi Aloksan. *Prosiding Penelitian SPeSIA Unisba*. ISSN 2460-6472.

Rachmawati, Farida Juliantina., Shofyatul Y.T. 2008. Perbandingan Angka Kuman pada Cuci Tangan dengan Beberapa Bahan sebagai Standarisasi Kerja di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Islam Indonesia. *Jurnal Penelitian dan Pengabdian*. Vol. 5. No. 1.

Radji, M. 2011. Buku Ajar *Mikrobiologi Panduan Mahasiswa Farmasi dan Kedokteran*. Semarang: EGC.

Rasyad, A.A., Mahendra. P., Hamdani.Y. 2012. Uji Nefrotoksik dari Ekstrak Etanol Biji Mahoni (*Swietenia mahagoni jacg*) Terhadap Tikus Putih Jantan Galur Wistar. *Jurnal Penelitian Sains*. Vol. 15. No. 2.

Rifa'I, M. 2011. *Autoimun dan Bioregulator*. Malang: UB Press.

- Rini, Ika Agus. 2013. *Profil Interleukin 4 (IL-4) dan Interferon Gamma (IFN γ) Mus musculus Balb-C Pasca Injeksi Kelenjar Saliva Anopheles maculatus (Diptera: Culicidae) sebagai Model Transmission Blocking Vaccine (TBV) Melawan Malaria*. Skripsi Tidak Diterbitkan. Jember: Jurusan Biologi FMIPA Unej.
- Risyad, A., Resi L.P., Siswarni MZ. 2016. Ekstraksi Minyak dari Biji Alpukat (*Persea Americana* Mill.) Menggunakan Pelarut Heptana. *Jurnal Teknik Kimia USU*. Vol.5. No. 1.
- Robinson T, 1995. *Kandungan Organik Tumbuhan Tinggi*. Diterjemahkan oleh Prof. Dr. Kosasih Padmawinata. Bandung: ITB.
- Rukmana, R. 1997. *Seri Budidaya Alpukat*. Yogyakarta: Penerbit Kanisius.
- Sabir, Ardo. 2008. *In Vitro* Antibacterial Activity of Flavonoids Trigona Sp Propolis Against *Streptococcus Mutans*. *Majalah Kedokteran Gigi (Dent. J.)*. Vol. 38. No. 3.
- Selimovic, Biljana Miljkovic. 2015. *Staphylococcus aureus*: Immunopathogenesis and Human Immunity. *Journal Acta facultatis medicae Naissensis*. Vol. 32. No. 4.
- Seyoum dkk. 2006. Structure-Radical Scavenging Activity Relationships of Flavonoids. *Journal Phytochemistry*, 67: 2058-2070.
- Shihab, Q. 2002. *Tafsir Al-Misbah Pesan, Kesan, dan Keserasian Al-Qur'an Volume 4*. Jakarta: Lentera Hati.
- Shihab, Q. 2002. *Tafsir Al-Misbah Pesan, Kesan, dan Keserasian Al-Qur'an Volume 8*. Jakarta: Lentera Hati.
- Shihab, Q. 2002. *Tafsir Al-Misbah Pesan, Kesan, dan Keserasian Al-Qur'an Volume 10*. Jakarta: Lentera Hati.
- Shihab, Q. 2002. *Tafsir Al-Misbah Pesan, Kesan, dan Keserasian Al-Qur'an Volume 13*. Jakarta: Lentera Hati.
- Shihab, Q. 2002. *Tafsir Al-Misbah Pesan, Kesan, dan Keserasian Al-Qur'an Volume 15*. Jakarta: Lentera Hati.
- Singh, Amanjot. 2015. Efficiency and Profitability of the Selected Pharmaceutical Companies: An Analytical Study. *Journal of Research in Pharmaceutical Science*. Vol. 2. Issue 7.

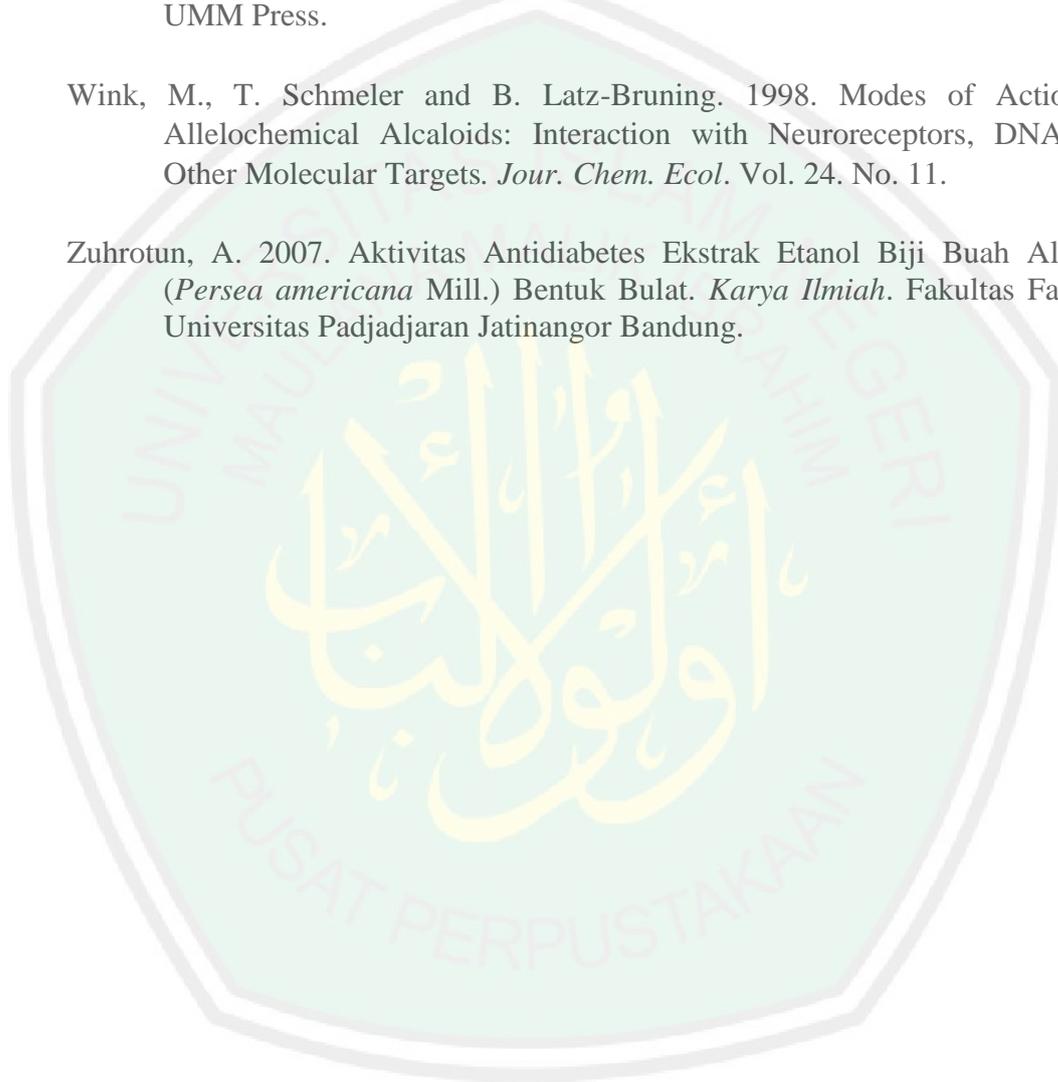
- Snyder, Peter. 2001. *Why Gloves are not The Solution to The Fingertip Washing Problem*. Hospitaly Institute of Technology and Management. St. Paul, MN.
- Soeroso, Adimadi. 2007. The Role of IL-10 Cytokine in Increased Intraoculae Pressure on Primary Open Angle Glaucoma. *Jurnal Oftalmologi Indonesia*. Vol. 5. No.2.
- Susilo J, Resti A. Efek imunomodulator fraksi etil asetat daun tempuyung (*Sonchus arvensis* Linn.) terhadap respon imun non spesifik pada mencit jantan galur Balb/C. <http://perpusnwu.web.id/karyailmiah/documents/3208.pdf>. (diunduh_pada tanggal 25 Februari 2014).
- Sutrisna, Em., Tanti A.S., Yunita E.O. 2015 The Hypoglicemic Effect of Avocado Seed (*Persea americana* Mill) and Histopathologic Profile. *International Journal of Pharma and Bio Sciences*. Vol. 6. No. 4.
- Tadokoro, C.E., M.S. Macedo., I.A. Abrahamsohn. 1996. Saponin Adjuvant Primes for a Dominant Interleukin-10 Production to Ovalbumin and to *Trypanosoma Cruzi* Antigen. *Journal Immunology*. Vol. 89.
- Tahir, Zulfikar. 2013. *Pengaruh Analgesia Multimodal Epidural Bupivakain 0,125% dan Parecoxib 40 mg Intravena terhadap Ratio Kadar Antara Interleukin-6 dengan Interleukin-10 dan Intensitas Nyeri pada Pembedahan Laparotomi Ginekologi*. Tesis Tidak Diterbitkan. Makassar: Konsentrasi Pendidikan Dokter Spesialis Terpadu Program Studi Biomedik Program Pascasarjana Universitas Hasanuddin.
- Tiwari, P., Kumar B., Kaur M and Kaur H. 2011. Phytochemical Screening and Extraction: A Review. *International Pharmaceutica Scientia*. Vol. 1. No. 1.
- Todar, K. 2008. *Staphylococcus aureus* and Staphylococcal Disease. USA: Wisconsin, Madison. <http://www.textbookofbacteriology.net/staph.html>. (diakses pada tanggal 18 Maret 2017).
- Tortora, G.J., Funke B.R., Case C.L. 2013. *Microbiology: an Introduction*. San Francisco (US): Pearson Education.
- Trubus. 2013. *Trubus Infi Kit: 100 Plus Herbal Indonesia, Bukti Ilmiah & Racikan Volume 11*. Depok: PT. Trubus Swadaya.
- Vasanthakumari, R. 2007. *Textbook of Microbiology*. New Delhi: BI Publication.

Wahyuni, Tri. 2010. *Biji Alpukat Lebih Tinggi Antioksidan Dibanding Buahnya*. <http://www.cnnindonesia.com/gaya-hidup/20160128062616-262-107229/biji-alpukat-lebih-tinggi-antioksidan-dibanding-buahnya/>. (Online) (diakses tanggal 10 Oktober 2016).

Waluyo, Lud. 2010. *Teknik dan Metode Dasar dalam Mikrobiologi*. Malang: UMM Press.

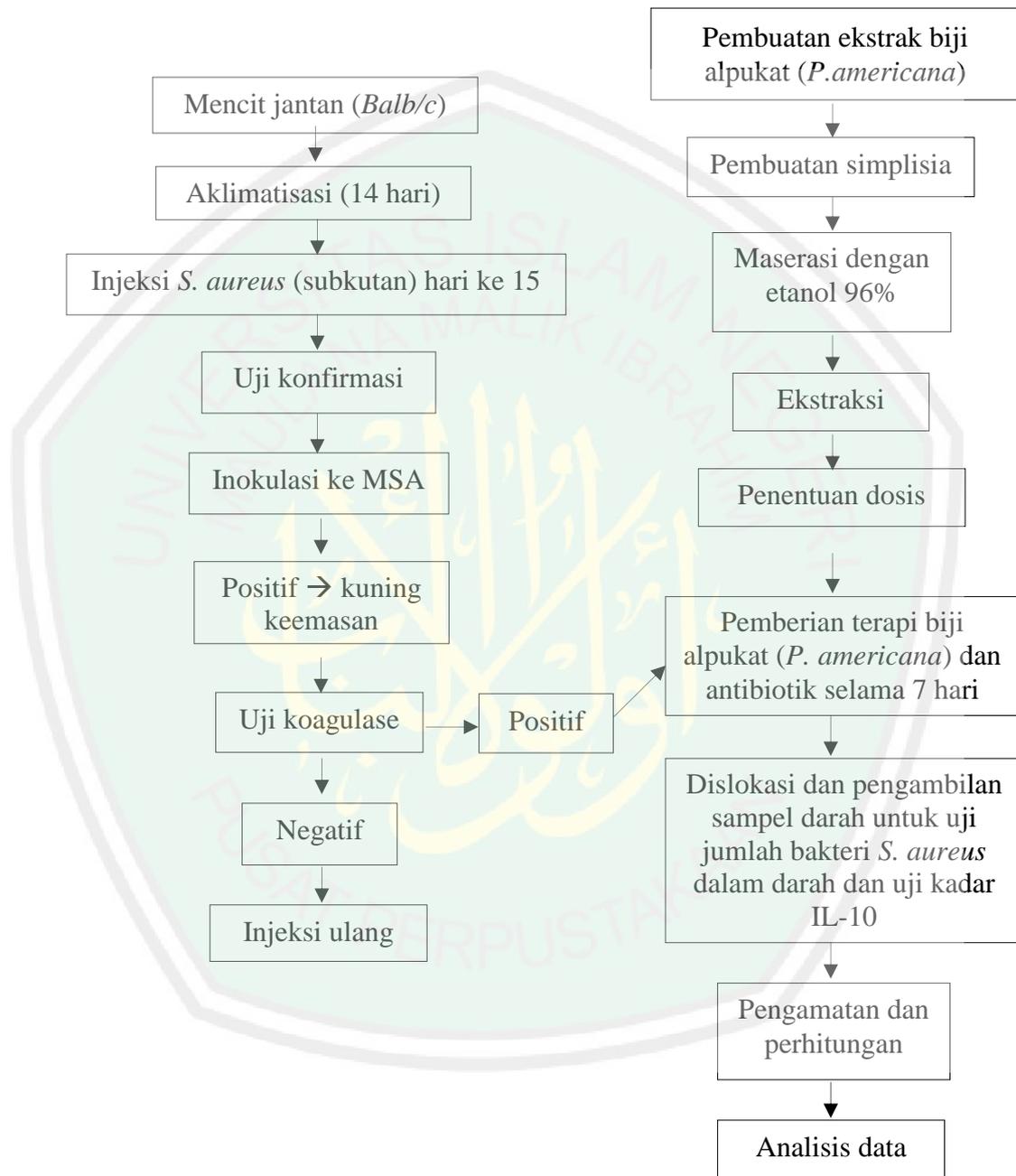
Wink, M., T. Schmeler and B. Latz-Bruning. 1998. Modes of Action of Allelochemical Alcaloids: Interaction with Neuroreceptors, DNA and Other Molecular Targets. *Jour. Chem. Ecol.* Vol. 24. No. 11.

Zuhrotun, A. 2007. Aktivitas Antidiabetes Ekstrak Etanol Biji Buah Alpukat (*Persea americana* Mill.) Bentuk Bulat. *Karya Ilmiah*. Fakultas Farmasi Universitas Padjadjaran Jatinangor Bandung.



LAMPIRAN

Lampiran 1. Alur Penelitian



Lampiran 2. Perhitungan Dosis

1) Dosis Ekstrak Etanol Biji Alpukat (*Persea americana* Mill.)

Penyiapan suspensi dosis ekstrak etanol biji alpukat (*Persea americana* Mill.)

menggunakan perhitungan sebagai berikut:

- a. Dosis 600 mg/kgBB (200 g tikus)

$$200 \text{ g} \times \frac{600 \text{ mg}}{1000 \text{ g}} = 120 \text{ mg}/200 \text{ g}$$

$$\begin{aligned} \text{Dosis untuk mencit (20 g)} &= 120 \text{ mg} \times \text{faktor konversi} \\ &= 120 \text{ mg} \times 0,14 \\ &= 16,8 \text{ mg} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Dosis untuk mencit (25 g)} &= \frac{\text{berat rata-rata} \times \text{dosis normal}}{\text{berat normal}} \\ &= \frac{25 \text{ g} \times 16,8 \text{ mg}}{20 \text{ g}} \\ &= 21 \text{ mg} \end{aligned}$$

Jadi diperoleh dosis 0,021 g untuk satu ekor mencit. Volume ekstrak yang disondekan sebanyak 0,5 ml per mencit yang sebelumnya telah dilarutkan dengan aquades steril.

- b. Dosis 1200 mg/kgBB (200 g tikus)

$$200 \text{ g} \times \frac{1200 \text{ mg}}{1000 \text{ g}} = 240 \text{ mg}/200 \text{ g}$$

$$\begin{aligned} \text{Dosis untuk mencit (20 g)} &= 240 \text{ mg} \times \text{faktor konversi} \\ &= 240 \text{ mg} \times 0,14 \\ &= 33,6 \text{ mg} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Dosis untuk mencit (25 g)} &= \frac{\text{berat rata-rata} \times \text{dosis normal}}{\text{berat normal}} \\ &= \frac{25 \text{ g} \times 33,6 \text{ mg}}{20 \text{ g}} \\ &= 42 \text{ mg} \end{aligned}$$

Jadi diperoleh dosis 0,042 g untuk satu ekor mencit. Volume ekstrak yang disondekan sebanyak 0,5 ml per mencit yang sebelumnya telah dilarutkan dengan aquades steril.

c. Dosis Helixim

Dosis untuk manusia = 200 mg/hari

Dosis untuk mencit → faktor konversi = 0,0026 (untuk 20 g mencit)

Dosis untuk mencit = $200 \text{ mg} \times 0,0026 = 0,52 \text{ mg}/20 \text{ g BB}$

Jadi diperoleh dosis 0,52 g untuk satu ekor mencit. Volume antibiotik yang disondekan sebanyak 0,5 ml per mencit yang sebelumnya telah dilarutkan dengan aquades steril.



Lampiran 3. Perhitungan Jumlah Koloni Bakteri *S. aureus* dalam Darah

Perlakuan	Ulangan	Jumlah Koloni Bakteri	Rata-Rata
Normal	1	0	0
	2	0	
	3	0	
	4	0	
	5	0	
Kontrol (-)	1	2	9,2
	2	5	
	3	18	
	4	10	
	5	11	
PO (kontrol +)	1	50	48,75
	2	86	
	3	26	
	4	33	
P1	1	20	20,5
	2	12	
	3	18	
	4	32	
P2	1	15	11,8
	2	7	
	3	6	
	4	16	
	5	15	

Lampiran 4. Nilai Rata-rata dan Standar Deviasi Jumlah Koloni Bakteri dalam Darah (SPSS)

Descriptives

jumlah_koloni

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
K+	5	9.2000	6.14003	2.74591	1.5761	16.8239	2.00	18.00
P0	4	48.7500	20.8000	14.24079	-.5388	78.5388	.00	86.00
P1	4	20.5000	8.39000	5.23068	1.8773	30.9227	.00	32.00
P2	5	11.8000	4.86826	2.17715	5.7553	17.8447	6.00	16.00
Total	18	22.5625	20.02866	4.47855	9.7263	28.4737	.00	86.00

Lampiran 5. Hasil Uji Statistik dengan SPSS Jumlah Koloni Bakteri dalam Darah

1. Uji Normalitas

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		jumlah_koloni
N		20
Normal Parameters ^a	Mean	19.1000
	Std. Deviation	20.02866
Most Extreme Differences	Absolute	.232
	Positive	.232
	Negative	-.170
Kolmogorov-Smirnov Z		1.038
Asymp. Sig. (2-tailed)		.232
a. Test distribution is Normal.		

2. Uji Homogenitas

Test of Homogeneity of Variances

jumlah_koloni

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
3.953	3	16	.028

3. Uji Welch

Robust Tests of Equality of Means

jumlah_koloni

	Statistic ^a	df1	df2	Sig.
Welch	1.524	3	8.237	.279

a. Asymptotically F distributed.

4. Uji Games-Howell

Multiple Comparisons

jumlah_koloni

Games-Howell

(I) perlakuan	(J) perlakuan	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
K+	P0	-29.80000	14.50310	.298	-86.8499	27.2499
	P1	-7.20000	5.90762	.638	-27.5982	13.1982
	P2	-2.60000	3.50428	.877	-13.9575	8.7575
P0	K+	29.80000	14.50310	.298	-27.2499	86.8499
	P1	22.60000	15.17103	.505	-33.1236	78.3236
	P2	27.20000	14.40625	.354	-30.1593	84.5593
P1	K+	7.20000	5.90762	.638	-13.1982	27.5982
	P0	-22.60000	15.17103	.505	-78.3236	33.1236
	P2	4.60000	5.66569	.847	-15.7913	24.9913
P2	K+	2.60000	3.50428	.877	-8.7575	13.9575
	P0	-27.20000	14.40625	.354	-84.5593	30.1593
	P1	-4.60000	5.66569	.847	-24.9913	15.7913

Lampiran 6. Hasil Uji Statistik dengan SPSS Kadar IL-10 dalam Darah

1. Uji Normalitas

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		jumlah_IL10
N		25
Normal Parameters ^a	Mean	57.3000
	Std. Deviation	10.60464
Most Extreme Differences	Absolute	.115
	Positive	.106
	Negative	-.115
Kolmogorov-Smirnov Z		.575
Asymp. Sig. (2-tailed)		.895

a. Test distribution is Normal.

2. Uji Homogenitas

Test of Homogeneity of Variances

jumlah_IL10

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
2.522	4	20	.073

3. Uji ANOVA

ANOVA

jumlah_IL10	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	519.100	4	129.775	1.191	.345
Within Groups	2179.900	20	108.995		
Total	2699.000	24			

4. Uji Duncan

jumlah_IL10

Duncan

perlakuan	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	
Normal	5	51.5000	
P2	5	54.1000	
P1	5	56.4000	
K+	5	60.0000	
K-	5	64.5000	
Sig.			.091

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Lampiran 7. Dokumentasi Alat Penelitian

PERALATAN PEMBUATAN EKSTRAK



Alat pemotong dan penghalus



Oven



Kulkas



Rotary evaporator



Labu ekstraksi



Gelas beker

PERALATAN DALAM UJI MIKROBIOLOGI (PEMBUATAN MEDIA, STERILISASI, PEMBUATAN SUSPENSI BAKTERI, UJI KONFIRMASI & PERHITUNGAN JUMLAH KOLONI BAKTERI DALAM DARAH)



Mikropipet



Mikrotube



Sentrifus



Vortex mixer



Blue tip



Plastik



Kulkas Mikroba



Neraca analitik



PERALATAN CEKOK

Sonde lambung

PERALATAN INJEKSI

Sprit 1 cc

PERALATAN PENGAMBILAN SAMPEL DARAH

Microcentrifuge



sprit



blood collect



mikropipet

Lampiran 8. Dokumentasi Bahan Penelitian

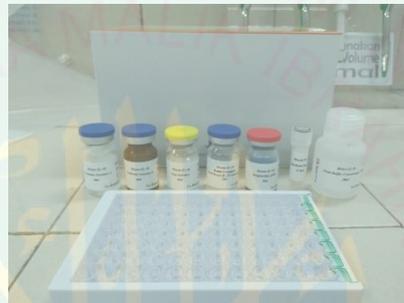


BAHAN UNTUK TERAPI

Ekstrak biji alpukat

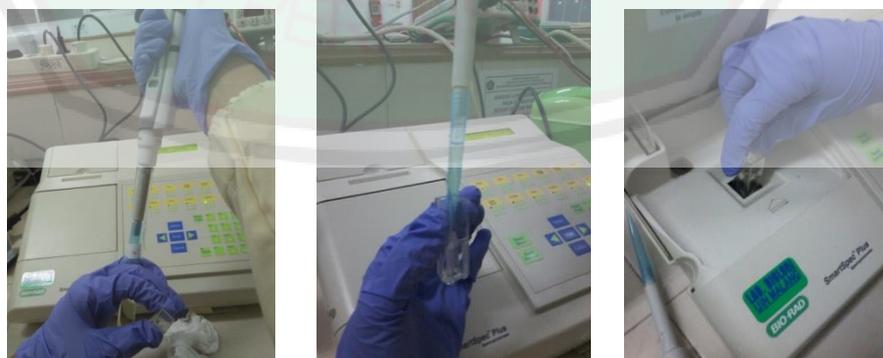


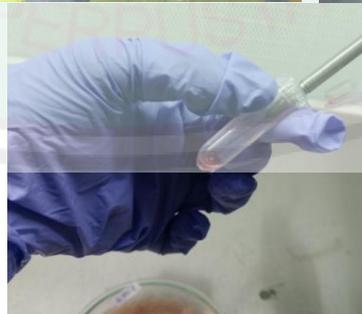
Antibiotik Helixim

BAHAN UNTUK UJI ELISA

ELISA KIT

Lampiran 9. Dokumentasi Proses Penelitian**PROSES PEMBUATAN EKSTRAK BIJI ALPUKAT**

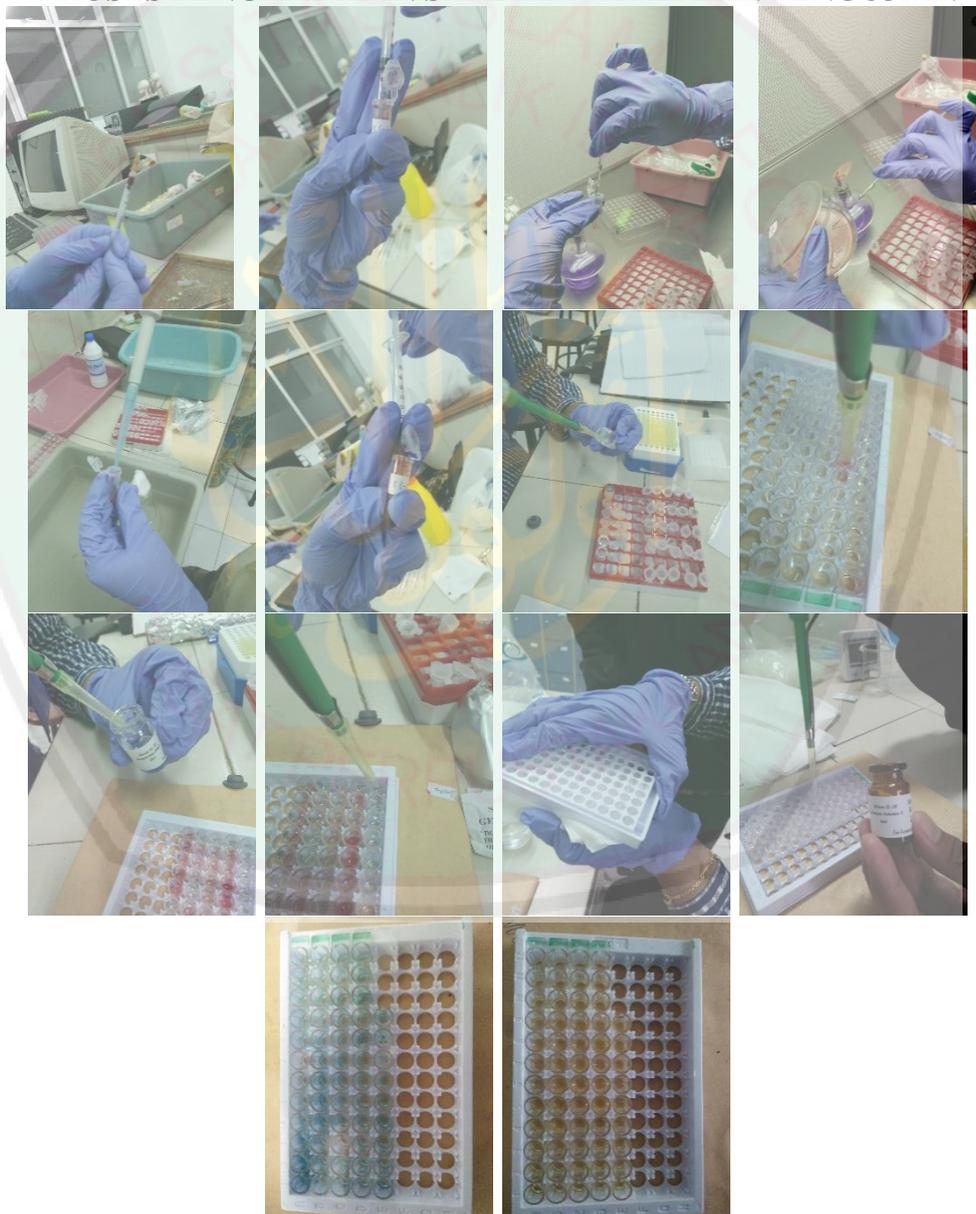
PROSES AKLIMATISASI**PROSES PEMBUATAN SUSPENSI BAKTERI****PROSES PENGECEKAN JUMLAH KOLONI BAKTERI**

PROSES INJEKSI SECARA INTRAPERITONIAL**UJI KONFIRMASI PERHITUNGAN KOLONI DAN UJI KOAGULASE**

PROSES PEMBERIAN TERAPI



PROSES PENGAMBILAN SAMPEL DARAH DAN PENGUJIAN



Lampiran 10. Kartu Bukti Konsultasi Biologi



KEMENTERIAN AGAMA
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM MALANG
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
JURUSAN BIOLOGI

Jl. Gajayana No. 50 Malang 65144 Telp./ Faks. (0341) 558933
 Website: <http://biologi.uin-malang.ac.id> Email: biologi@uin-malang.ac.id

BUKTI KONSULTASI SKRIPSI

Nama : Aulia Nur Kumala Dewi
 NIM : 13620054
 Program Studi : Biologi
 Semester : 13 (tiga belas) TA. 2013
 Pembimbing : Dr. Hj. Retno Susilowati, M.Si
 Judul Skripsi : Uji Aktivitas Ekstrak Etanol Biji Alpukat (*Persea americana* Mill.) terhadap Kadar IL-10 dan Jumlah Bakteri dalam Darah Mencit (*Mus musculus*) yang Diinfeksi *Staphylococcus aureus*

No	Tanggal	Uraian Materi Konsultasi	Ttd. Pembimbing
1	07 September 2016	Konsultasi konsep penelitian	1 f
2	27 Januari 2017	Acc judul dan konsep penelitian	2 f
3	30 Januari 2017	Konsultasi BAB I	3 f
4	7 Februari 2017	Konsultasi BAB III dan hasil revisi BAB I	4 f
5	20 Februari 2017	Konsultasi hasil revisi BAB I dan BAB III	5 f
6	01 Maret 2017	Konsultasi BAB II	6 f
7	08 Maret 2017	Konsultasi hasil revisi BAB II	7 f
8	17 Maret 2017	Konsultasi hasil revisi BAB I, II, dan III	8 f
9	21 Maret 2017	Acc BAB I, II, dan III	9 f
10	10 Agustus 2017	Konsultasi data hasil penelitian	10 f
11	15 Agustus 2017	Konsultasi analisis data	11 f
12	6 Maret 2018	Konsultasi hasil revisi analisis data	12 f
13	15 Mei 2018	Konsultasi BAB IV	13 f
14	9 April 2019	Konsultasi hasil revisi BAB IV	14 f
15	28 Agustus 2019	Konsultasi hasil revisi BAB IV	15 f
16	10 September 2019	Konsultasi hasil revisi BAB IV	16 f
17	3 Oktober 2019	Konsultasi BAB IV dan V	17 f
18	26 November 2019	Acc skripsi	18 f

Pembimbing Skripsi,

Dr. Hj. Retno Susilowati, M.Si
 NIP. 19671113 1994 02 2001

Malang, 26 November 2019

Ketua Jurusan,



Rozaidi, M.Si., D.Sc
 NIP. 19810201 200901 1 019

Lampiran 11. Kartu Bukti Konsultasi Agama



KEMENTERIAN AGAMA
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM MALANG
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
JURUSAN BIOLOGI

Jl. Gajayana No. 50 Malang 65144 Telp./ Faks. (0341) 558933
Website: <http://biologi.uin-malang.ac.id> Email: biologi@uin-malang.ac.id

BUKTI KONSULTASI AGAMA

Nama : Aulia Nur Kumala Dewi
NIM : 13620054
Program Studi : Biologi
Semester : 13 (tiga belas) TA. 2013
Pembimbing : Umayyatus Syarifah M.A
Judul Skripsi : Uji Aktivitas Ekstrak Etanol Biji Alpukat (*Persea americana* Mill.) terhadap Kadar IL-10 dan Jumlah Bakteri dalam Darah Mencit (*Mus musculus*) yang Diinfeksi *Staphylococcus aureus*

No	Tanggal	Uraian Materi Konsultasi	Ttd. Pembimbing
1	8 Maret 2017	Konsultasi BAB I dan BAB III	1
2	27 Oktober 2017	Konsultasi BAB I, BAB III dan BAB IV	2
3	26 November 2019	Revisi BAB I, BAB III dan BAB IV	3
4	2 Desember 2019	Acc skripsi	4

Pembimbing Skripsi,

an.

Umayyatus Syarifah M.A
NIP. 19820925 200901 2 005

Malang, 26 November 2019
Ketua Jurusan,

Romadi, M.Si., D.Sc
NIP. 19810204 200901 1 019



Lampiran 12. Form Checklist Plagiasi



KEMENTERIAN AGAMA
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM MALANG
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
JURUSAN BIOLOGI

Jl. Gajayana No. 50 Malang 65144 Telp./ Faks. (0341) 558933
Website: <http://biologi.uin-malang.ac.id> Email: biologi@uin-malang.ac.id

Form Checklist Plagiasi

Nama : Aulia Nur Kumala Dewi
NIM : 13620054
Judul : Uji Aktivitas Ekstrak Etanol Biji Alpukat (*Persea americana* Mill.) terhadap kadar IL-10 dan Jumlah Bakteri dalam Darah Mencit (*Mus musculus*) yang diinfeksi *Staphylococcus aureus*

No	Tim Checkplagiasi	Skor Plagiasi	TTD
1	Azizatur Rohmah, M.Sc		
2	Berry Fakhry Hanifa, M.Sc		
3	Bayu Agung Prahardika, M.Si	24%	

Mengetahui,
Ketua Jurusan Biologi
Romaidi, M.Si, D.Sc