

**LEMBARAN PENGESAHAN
LAPORAN HASIL PENELITIAN**

Judul : Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Kulit Buah Alpukat (*Persea americana Mill*) terhadap *Staphylococcus aureus* Secara In Vitro

Nama : Eka Permata Sari Br Sabombing
NPM : 20000033

Dosen Pembimbing I

Dosen Pembimbing II


(dr. Sufida, SpPA)


(Runggu Rana J. Napitupulu, M.Kes)

**BAB I
PENDAHULUAN**

Salah satu masalah utama kesehatan di dunia termasuk di Indonesia adalah penyakit infeksi.¹ Infeksi merupakan salah satu penyebab kematian dan kesakitan di rumah sakit atau fasilitas kesehatan, termasuk pada ibu dan bayi baru lahir.² Pada tahun 2018 *World Health Organization* (WHO), *World Bank* dan *Organization for Economic Co-operation and Development* (OECD) mencatat bahwa seseorang yang menjalani perawatan di rumah sakit atau fasilitas kesehatan dengan layanan kurang memenuhi standar memiliki peluang sebesar 8-10% akan mengalami infeksi yang disebut dengan infeksi nosokomial.³ Penyakit kulit juga menjadi perhatian di negara berkembang, prevalensinya dapat berkisar 20-80%.⁴ Menurut data Kementerian Kesehatan Republik Indonesia (Kemenkes RI) pada tahun 2020 prevalensi kematian pada kelompok anak usia 1 sampai 11 bulan akibat pneumonia sebanyak 73,9% dan disebabkan oleh diare sebanyak 14,5%.⁵

Penyakit infeksi merupakan salah satu penyakit yang terjadi karena invasi dan perkembangbiakan mikroorganisme seperti bakteri, jamur, parasit, dan virus. Proses infeksi dimulai ketika mikroba berinteraksi dengan inangnya pada tubuh manusia sehingga membahayakan tubuh manusia akibat terjadinya kerusakan pada tubuh inang. Bakteri yang menyebabkan penyakit pada manusia disebut dengan bakteri patogen.⁶

Salah satu contoh bakteri yang menyebabkan penyakit infeksi adalah

Staphylococcus aureus. Bakteri ini dapat menyebabkan gangguan pada paru, jantung, dan infeksi pembuluh darah.⁷ Perineum, lubang hidung dan aksila adalah tempat terbanyak bakteri *Staphylococcus aureus* berkoloni dan menimbulkan infeksi.⁸ Pada kulit, mulut, telinga dan saluran pernapasan, *Staphylococcus aureus* merupakan flora normal, tidak menyebabkan penyakit.⁹

Antibiotik atau disebut juga antibakteri merupakan obat yang dipakai untuk mengobati penyakit infeksi yang disebabkan oleh bakteri. Pemakaian antibiotik sering menimbulkan efek samping yang merugikan pasien. Efek samping yang umum terjadi pada saluran pencernaan seperti mual, muntah dan diare.¹⁰ Contoh

lain dari efek samping penggunaan antibiotik adalah bercak atau kemerahan pada kulit, gatal dan bengkak. Pemakaian antibiotika yang tidak rasional dapat menyebabkan terjadinya super infeksi dan timbulnya resistensi antibiotik.¹¹ Resistensi antibiotik dapat membahayakan nyawa pasien karena infeksi sulit diobati sehingga terjadi peningkatan angka kesakitan, resiko kematian dan biaya pelayanan kesehatan juga meningkat karena lama pengobatan di rumah sakit.¹²

Berbagai efek samping yang ditimbulkan oleh antibiotik menyebabkan pengobatan dari bahan alami semakin dibutuhkan. Obat yang berasal dari bahan alami tumbuhan disebut obat herbal. Efek samping obat herbal relatif sedikit sehingga dinilai lebih aman dan dapat mengatasi masalah resistensi antibiotik.¹³

Indonesia adalah negara yang kaya akan berbagai macam jenis tanaman yang bisa dimanfaatkan sebagai obat tradisional. Perkembangan pemanfaatan bahan alam sebagai obat tradisional dengan penggunaan yang lebih baik sekarang lebih diminati, hal ini disebabkan karena obat tradisional relatif mudah didapat.¹⁴ Salah satu tanaman yang berkhasiat sebagai obat-obatan adalah tanaman alpukat.¹⁵ Pemanfaatan buah alpukat tidak terbatas pada buahnya saja, hampir seluruh bagian alpukat bermanfaat bagi kesehatan tubuh. Banyak manfaat penting buah alpukat seperti menangkal radikal bebas, menurunkan tekanan darah, menjaga kesehatan kulit dan rambut, menurunkan kadar gula dan menghambat pertumbuhan bakteri.¹⁶

Beberapa penelitian melakukan uji coba untuk mengetahui khasiat dari alpukat untuk kesehatan. Buah alpukat memiliki kandungan karotenoid vitamin A, B dan C yang sangat berguna bagi kulit kering.^{17,18} Kandungan senyawa zat aktif flavonoid, alkaloid, tannin dan quersetin yang terdapat dalam daun alpukat mampu menghambat pertumbuhan bakteri seperti *Staphylococcus* sp, *Pseudomonas* sp, *Proteus* sp, *Escherichea* sp, dan *Bacillus* sp.¹⁹ Biji alpukat juga memiliki kandungan flavonoid dan tannin yang merupakan alternatif dalam penyembuhan luka.²⁰ Flavonoid bekerja sebagai antibakteri dengan cara menyusun senyawa kompleks bersama protein ekstraseluler yang terlarut sehingga mampu menghancurkan membran sel bakteri sehingga keluarlah senyawa intraseluler.²¹

Kandungan senyawa aktif flavonoid tidak hanya terdapat dalam daun dan biji alpukat, namun juga terdapat dalam kulit buah alpukat.²² Penelitian yang

dilakukan oleh Raymond dan Dyke pada tahun 2010, Morkuende, dkk pada tahun 2011 serta penelitian Aminah, dkk pada tahun 2017 mendapatkan hasil bahwa ekstrak kulit buah alpukat memiliki beberapa aktivitas dan manfaat, salah satunya sebagai antimikroba terhadap bakteri gram positif dan gram negatif.²³⁻²⁵ Adanya senyawa fenolik dalam ekstrak akan mengubah fungsi membran sel sehingga mampu menghambat pertumbuhan bakteri.²⁶ Sebagian besar fenolik dalam kulit buah alpukat adalah flavonoid seperti katekin, prosianidin, dan quercetin.²⁷

Berdasarkan berbagai uraian tersebut peneliti tertarik untuk menguji efektivitas antibakteri kulit buah alpukat (*Persea americana Mill*) terhadap *Staphylococcus aureus* dengan konsentrasi yang digunakan adalah 25%, 50%, 75%, 100%.

1.1 Rumusan Masalah

Bagaimanakah efektifitas antibakteri ekstrak kulit buah alpukat (*Persea americana Mill*) terhadap pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus*?

1.2 Hipotesis

Hipotesis dalam penelitian ini adalah ekstrak kulit buah alpukat (*Persea americana Mill*) memiliki efek antibakteri terhadap pertumbuhan *Staphylococcus aureus*.

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan Umum

Menganalisis efektifitas antibakteri ekstrak kulit buah alpukat (*Persea americana Mill*) terhadap bakteri *Staphylococcus aureus*.

1.3.2 Tujuan Khusus

1. Untuk mengetahui diameter zona hambat ekstrak kulit buah alpukat (*Persea Americana Mill*) dalam berbagai konsentrasi terhadap bakteri *Staphylococcus aureus*.
2. Untuk menilai konsentrasi ekstrak kulit buah alpukat (*Persea americana Mill*) dengan daya hambat terbesar terhadap pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus*.

3. Untuk membandingkan daya hambat antibakteri ekstrak kulit buah alpukat (*Persea americana Mill*) dengan menggunakan kontrol positif dan kontrol negatif.

1.4 Manfaat Penelitian

1. Bagi peneliti :

Penelitian ini diharapkan dapat menjadi wadah untuk menambah pengetahuan dan wawasan tentang manfaat kulit buah alpukat (*Persea americana Mill*) sebagai antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus*.

2. Bagi Instansi :

Penelitian ini diharapkan dapat menambah referensi bagi Fakultas Kedokteran Universitas HKBP Nommensen Medan mengenai manfaat kulit buah alpukat (*Persea americana Mill*) sebagai antibakteri.

3. Bagi masyarakat :

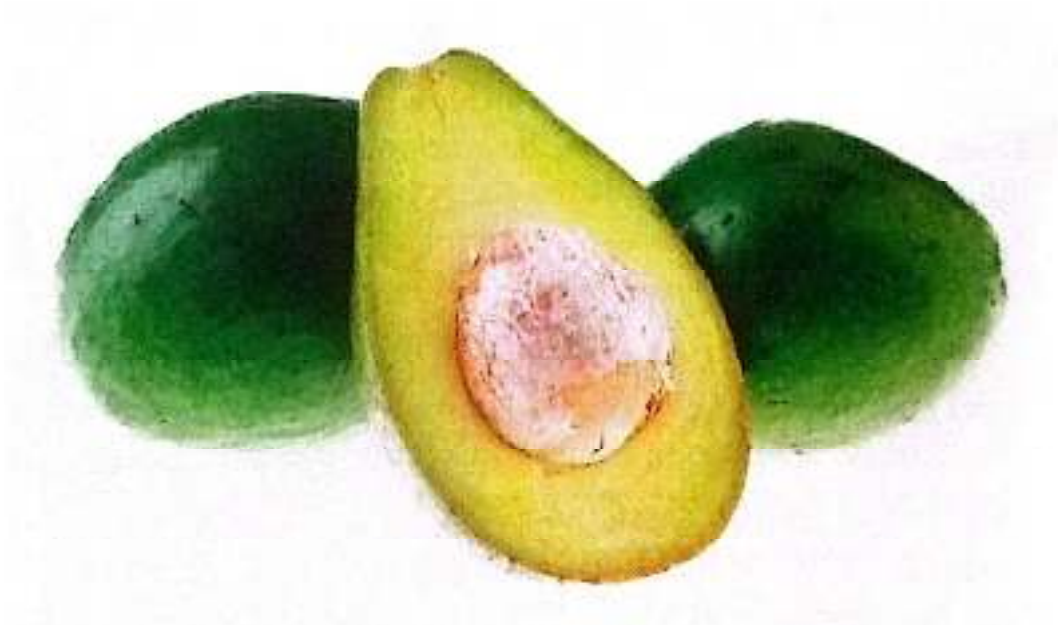
Penelitian ini diharapkan sebagai sumber informasi bagi masyarakat mengenai efektivitas kulit buah alpukat sebagai antibakteri terhadap infeksi *Staphylococcus aureus*.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Alpukat

Alpukat (*Persea americana Mill*) merupakan salah satu tumbuhan dari keluarga *Lauraceae*. Istilah “alpukat” berasal dari kata *Nahuatl* “ahuacatl”, yang artinya testis. Asal buah alpukat dari daerah pegunungan yang terdapat di antara Meksiko dan Guatemala, tertuju pada daerah di Tehuacan, Puebla (Meksiko).²⁸ Buah alpukat dapat hidup di daerah tropis juga subtropis. Buah alpukat mempunyai banyak khasiat sehingga tidak asing lagi menjadi salah satu tanaman obat. Hal inilah yang membuat banyak peneliti tertarik untuk menjadikannya sebagai topik dalam penelitian.²⁹



Gambar 2. 1. Buah Alpukat³⁰

2.1.1 Taksonomi

Taksonomi alpukat dalam tumbuh-tumbuhan adalah sebagai berikut:³¹

- Divisi : *Spermatophyta*
- Anak Divisi : *Angiospermae*
- Kelas : *Dicotyledoneae*
- Bangsa : *Ranales*
- Keluarga : *Lauraceae*

Marga : *Persea*

Spesies : *Persea americana Mill.*

2.1.2 Morfologi alpukat

Tanaman alpukat dapat tumbuh hingga 20 m dengan akar tunggang tunggal atau dikotil. Panjang dari batangnya dapat mencapai 5 meter dan diameternya 90 cm. Batang alpukat berkayu, berwarna coklat pekat dan berbentuk bulat disertai cabang-cabang dan bulu-bulu halus. Daun alpukat memiliki tulang menyirip bisa mencapai 40 cm dan lebarnya 3-10 cm. Daun alpukat memiliki bentuk yang bervariasi seperti bulat telur, oval, bulat ataupun lanset dengan bagian ujung yang sedikit meruncing. Daun yang tunggal simetris ini berwarna merah saat masih muda dan seiring bertambah usia akan menjadi warna hijau tua. Selain bentuk daunnya yang bervariasi, bentuk dari buah alpukat juga beragam, mulai dari belah ketupat, ellipsoid, piriform ataupun obovate. Panjang buah alpukat 7 sampai 20 cm, lebarnya mencapai 15 cm dengan berat 100 sampai 1000 g. Umumnya daging buah alpukat memiliki warna yang pucat hingga kuning mentega dan rasanya yang hambar hingga seperti kacang. Warna yang tampak pada kulitnya seperti ungu kemerahan, hijau tua, hijau kekuningan, atau ungu tua dan biasanya terdapat bintik-bintik atau titik-titik kuning. Ketebalannya mulai kurang dari 1 mm hingga 6 mm.^{32,33}

2.1.3 Kandungan dan manfaat kulit buah alpukat

Kulit buah alpukat telah dibuktikan dalam beberapa penelitian mengandung senyawa bioaktif dengan jumlah yang besar, contohnya asam lemak, gula, antosianin, asam organik, karotenoid, klorofil, tokoferol, sterol dan senyawa lainnya. Kulit buah alpukat sudah digunakan sejak jaman kuno sebagai pengobatan tradisional. Beberapa manfaat kulit buah alpukat yang sudah dibuktikan ialah untuk persediaan sumber energi, menjaga kesehatan mata, mengendalikan berat badan, antiinflamasi, antikanker, menangkal mutagen (zat yang menyebabkan mutasi gen) atau antigenotoksik (zat yang merusak materi genetik), kardioprotektif, menurunkan tekanan darah serta menurunkan kadar kolesterol. Salah satu kandungan khas kulit buah alpukat adalah fenolik. Fenolik dapat bermanfaat sebagai antijamur, antibakteri, antioksidan, serta pertahanan untuk kesehatan manusia, yang bisa diaplikasikan dalam bentuk makanan.³⁴

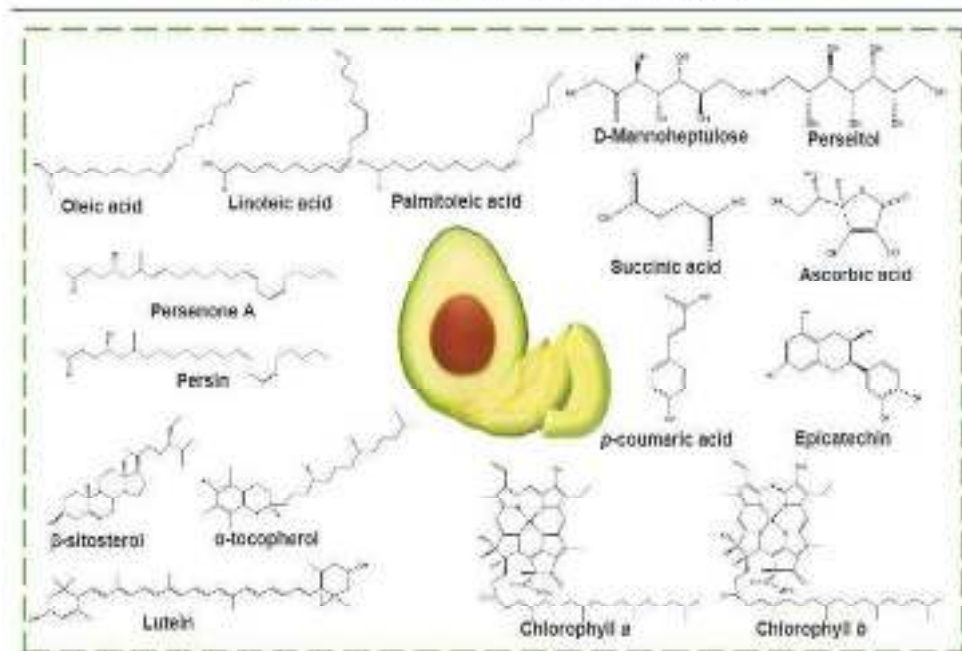


Figure 1. Main health-related compounds in avocado.
 Figura 1. Principales compuestos protectores de la salud en el aguacate.

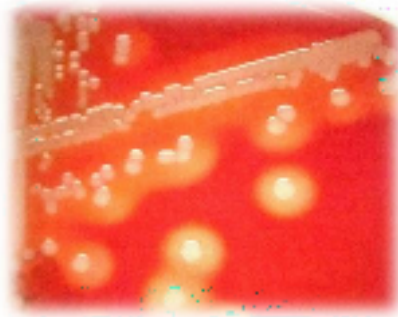
Gambar 2. 2. Alpukat dan Kandungan Senyawa dalam Alpukat²⁸

2.2 Bakteri *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus merupakan bakteri gram positif, tak bergerak atau aerob fakultatif dengan katalase positif didalam keluarga *Micrococcaceae*. Nama ini berasal dari pengelompokan khas kuman ini (Bahasa Yunaninya *staphyle*, “setangkai buah anggur”) yang diamati secara mikroskopik pada sediaan pewarnaan yang diambil dari koloni yang tumbuh pada media solid. *Staphylococcus aureus* merupakan patogen utama untuk manusia, dikenal dengan warna keemas-emasan dari pertumbuhan koloni secara anaerob pada media padat. Hampir setiap orang akan mengalami beberapa jenis infeksi *Staphylococcus aureus* sepanjang hidup, dengan kisaran keparahan dari keracunan makanan atau infeksi kulit minor hingga infeksi berat yang mengancam jiwa.^{35,36}



Gambar 2. 3. Pewarnaan gram *Staphylococcus aureus* dengan pembesaran asli x 1.000.³⁵



Gambar 2. 4. Koloni *Staphylococcus aureus* pada cawan agar darah sesudah inkubasi 24 jam.³⁵

2.2.1 Taksonomi *Staphylococcus aureus*

Klasifikasi *Staphylococcus aureus* adalah:

- Domain : *Bacteria*
- Kelas : *Bacilli*
- Ordo : *Bacillales*
- Famili : *Staphylococcaceae*
- Genus : *Staphylococcus*
- Spesies : *Staphylococcus aureus*.⁹

2.2.2 Morfologi *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus merupakan bakteri Gram-positif dengan koloni berbentuk mirip anggur, berwarna keemasan atau kuning. Aureus artinya emas atau kuning. *Staphylococcus aureus* dapat hidup secara aerobik atau anaerobik (fakultatif) dengan suhu 18°C sampai 40°C. Tes identifikasi biokimia secara umum termasuk katalase, positif pada seluruh spesies *Staphylococcus* patogenik.

Koagulase positif merupakan ciri yang membedakan *Staphylococcus* lainnya. Perbedaan *Staphylococcus saprophyticus* dengan *Staphylococcus aureus* adalah sifat sensitif terhadap novobiocin. Fermentasi manitol positif merupakan salah satu ciri untuk membedakan *Staphylococcus aureus* dari *Staphylococcus epidermidis*.³⁷

2.2.3 Daya tahan bakteri *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus adalah bakteri yang tidak memiliki spora dan termasuk bakteri terkuat dalam daya tahannya. Pada agar miring *Staphylococcus aureus* dapat tumbuh sampai berbulan-bulan, baik dengan suhu lemari es maupun pada suhu kamar. Dalam keadaan kering pada benang, kertas, kain, bakteri ini dapat hidup selama 6-14 minggu. Daya tahan bakteri ini berbeda-beda pada bermacam-macam zat kimia, seperti Tingtura iodii 2% selama 1 menit, fenol 2% selama 15 menit, alkohol 50-70% selama 1 jam, HgCl₂ 1% selama 10 menit, dan H₂O₂ 3% selama 3 menit.³⁸

2.2.4 Struktur antigen *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus menyimpan polisakarida antigenik dan protein serta substansi lain yang terkandung dalam dinding sel. Peptidoglikan, polimer polisakarida serta subunit yang terkandung didalamnya merupakan kerangka luar pada dinding sel. Hal utama yang terjadi saat patogenesis infeksi ialah penghancuran peptidoglikan oleh asam kuat atau paparan terhadap lisozim. Hal ini akan memicu produksi interleukin-1 dan antibodi opsonik dari monosit, yang dapat menjadi *chemoattractant* pada lekosit polimorfonuklear yang mempunyai aktivitas mirip endotoksin sehingga mengaktifkan komplemen.³⁹

Protein A adalah komponen dinding sel galur *Staphylococcus aureus* dan merupakan protein permukaan bakteri yang telah dicirikan diantara sekelompok adhesin yang disebut molekul matriks adhesif pengenal komponen permukaan mikroba. Beberapa galur *Staphylococcus aureus* mempunyai kapsul, yang menghambat fagositosis oleh leukosit PMN. Sebagian besar *Staphylococcus aureus* mempunyai koagulase atau faktor penggumpal pada permukaan dinding sel, koagulase terikat secara nonenzimatik pada fibrinogen, menghasilkan agregasi bakteri.³⁵

2.2.5 Patogenesis *Staphylococcus aureus*

Infeksi yang disebabkan oleh *Staphylococcus* biasanya akibat dari gabungan faktor virulensi bakteri dan penurunan pertahanan pejamu. Faktor mikroba yang penting meliputi kemampuan *Staphylococcus* untuk bertahan hidup di bawah kondisi yang berat, unsur pokok dinding selnya, produksi enzim dan toksin yang menyelenggarakan invasi jaringan, daya tahannya untuk tetap melakukan fagosit khusus secara intraseluler dan potensinya untuk mendapatkan resistensi terhadap antimikroba. Faktor pejamu yang penting meliputi sawar mukokutaneus yang utuh, jumlah yang memadai dari neutrophil yang berfungsi dan penyingkiran benda asing atau jaringan yang mati.³⁶

Staphylococcus aureus memproduksi koagulase yang mengkatalisis perubahan fibrinogen menjadi fibrin dan dapat membantu organisme ini untuk membentuk barisan perlindungan. Bakteri ini juga memiliki reseptor terhadap permukaan sel pejamu dan protein matriks (misalnya fibronektin, kolagen) yang membantu organisme ini untuk melekat. Bakteri ini memproduksi enzim link ekstraseluler (misalnya lipase), yang memecah jaringan pejamu dan membantu invasi.⁹

2.2.6 Gambaran klinis infeksi akibat *Staphylococcus aureus*

Infeksi lokal akibat *Staphylococcus* muncul sebagai jerawat, folikulitis atau bintil yang membengkak (abses), impetigo dan infeksi luka. Kebanyakan timbul reaksi inflamasi yang kuat, terlokalisasi, nyeri dan bagian yang membentuk pus ditengah akan cepat sembuh saat nanah dikeluarkan. Dinding fibrin dan sel di sekeliling inti abses lebih cenderung mencegah menyebarnya organisme dan tidak boleh dirusak oleh manipulasi atau trauma. Infeksi akibat *Staphylococcus aureus* juga dapat terjadi akibat kontaminasi langsung terhadap luka, misalnya infeksi *Staphylococcus* pada luka setelah operasi atau infeksi pasca trauma (osteomielitis kronis setelah patah tulang terbuka, meningitis setelah fraktur tengkorak).⁴¹

Penyebaran *Staphylococcus aureus* dan perkembangan bakteri dapat menyebabkan endokarditis, osteomielitis hematogen akut, meningitis, atau infeksi paru-paru. Gambaran klinisnya mirip dengan infeksi yang ditularkan melalui aliran

darah. Biasanya lokalisasi sekunder pada organ atau sistem, ada gejala dan tanda disfungsi organ lokal dan banyak nanah (supurasi). Keracunan makanan akibat enterotoksin *Staphylococcus* biasanya terjadi dengan masa inkubasi 1 sampai 8 jam. Gejala yang ditimbulkan keracunan makanan akibat *Staphylococcus* berupa mual hebat, muntah, diare dan penyembuhan yang cepat serta tidak ditemukannya demam. Sindrom syok toksik berkembang secara tiba-tiba dan gejalanya meliputi demam tinggi, muntah, diare, mialgia, ruam merah terang, dan hipotensi, disertai gagal jantung dan ginjal pada kasus yang parah.³⁹

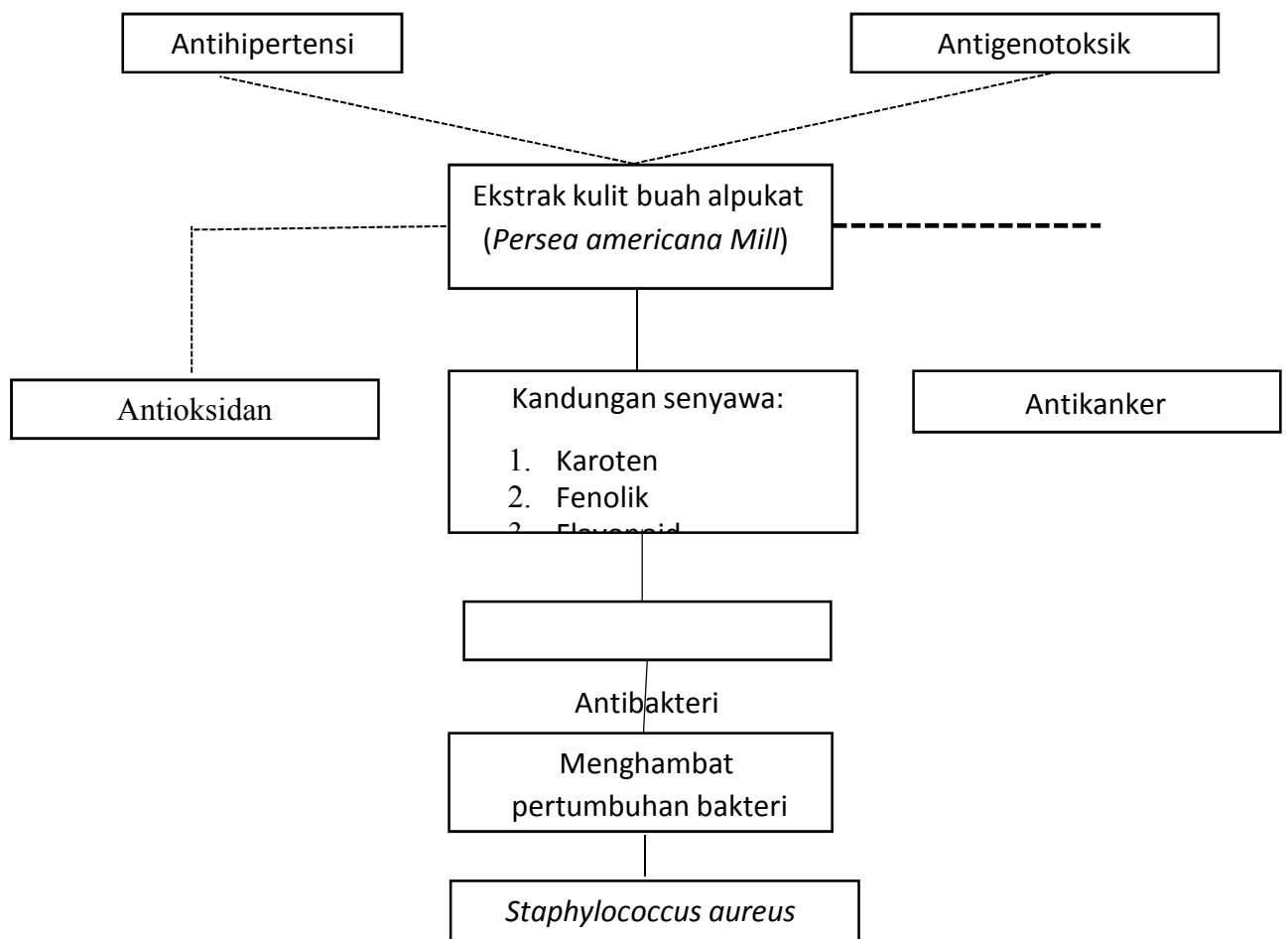
2.3 Metode uji efektivitas antibakteri

Ada 2 metode untuk menguji aktivitas antibakteri antara lain metode difusi dan metode delusi. Metode difusi merupakan metode yang kerap kali digunakan untuk menganalisis aktivitas antibakteri. Metode difusi dapat dilakukan dengan 3 cara yaitu metode sumuran, metode cakram, dan metode silinder. Cara kerja metode difusi dimulai dari terdifusinya senyawa antibakteri ke media padat mikroba uji yang telah diinokulasikan. Zona hambat pertumbuhan bakteri dilihat dari ada tidaknya daerah bening di atas kertas cakram.⁴⁰

Metode sumuran ialah metode yang diawali dengan membuat lubang yang tegak lurus pada agar padat yang sudah diinokulasikan pada bakteri uji. Jumlah dan posisi lubang diselaraskan dengan tujuan dari penelitian yang ingin dilakukan, selanjutnya lubang diisi dengan sampel yang akan diuji. Mengamati pertumbuhan bakteri dilakukan setelah proses inkubasi, dengan melihat hambatan disekeliling lubang yang terbentuk. Kelebihan metode sumuran dibandingkan metode yang lainnya ialah dalam proses pengukuran luas zona hambatnya, karena aktivitas bakteri tidak hanya dipermukaan atas agar nutrien, tetapi sampai ke bawah. Kekurangan metode sumuran terletak pada proses pembuatannya yang sedikit sulit. Adanya sisa-sisa agar di media yang digunakan dalam membuat sumuran, menyebabkan media agar yang terletak disekeliling sumuran besar kemungkinan akan pecah atau retak. Hal ini dapat mengganggu proses peresapan antibiotik ke dalam media sehingga mempengaruhi diameter zona bening yang terbentuk saat melakukan uji sensitivitas.⁴⁰

Metode cakram dilakukan dengan kertas cakram sebagai media supaya menyerap bahan antimikroba yang diujikan dalam bahan uji. Kertas cakram kemudian ditempatkan pada permukaan media agar yang sudah diinokulasikan dengan biakan mikroba uji, lalu diinkubasikan selama 18-24 jam dengan suhu 35°C. Aktivitas pertumbuhan mikroba diamati dengan melihat area atau zona bening yang terbentuk di sekitar kertas cakram karena nilai diameter zona bening yang terbentuk sebanding dengan jumlah mikroba yang berada pada kertas cakram. Kelebihan pada metode ini ialah kecepatan dalam proses penyiapan cakram.⁴⁰

2.4 Kerangka teori



Gambar 2. 5. Kerangka Teori

2.5 Kerangka konsep



Gambar 2. 6. Kerangka Konsep Penelitian

BAB 3

METODE PENELITIAN

3.1. Desain Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental murni laboratorium (*True Eksperimental*) secara in vitro untuk melihat efektivitas antibakteri buah alpukat terhadap *Staphylococcus aureus* dengan menggunakan metode difusi cakram.

3.2. Tempat dan Waktu Penelitian

Ekstraksi buah alpukat dilakukan di Laboratorium Fitokimia Fakultas Farmasi Universitas Sumatera Utara pada bulan Agustus 2023. Penelitian untuk menguji efektivitas antibakteri buah alpukat terhadap *Staphylococcus aureus* dilakukan di Laboratorium Penelitian Fakultas Kedokteran Universitas HKBP Nommensen pada bulan September 2023.

3.3. Sampel Penelitian

Bakteri yang digunakan dalam penelitian adalah *Staphylococcus aureus* yang dikultur dalam media agar.

3.4. Bahan Uji

Bahan yang diuji dalam penelitian ini adalah ekstrak kulit buah alpukat dalam berbagai konsentrasi (25%, 50%, 75% dan 100%) terhadap bakteri *Staphylococcus aureus*.

3.5. Pengulangan Sampel

Pengulangan sampel dilakukan dalam penelitian ini untuk mendapatkan hasil yang lebih kuat dengan menggunakan rumus Federer :

$$(n - 1)(t - 1) \geq 15$$

Keterangan :

n = jumlah pengulangan tiap perlakuan

t = jumlah perlakuan yang dilakukan

Penelitian ini dilakukan sebanyak 6 perlakuan yaitu ekstrak kulit buah alpukat dengan konsentrasi 25%, 50%, 75%, 100%, serta perlakuan terhadap kontrol yaitu ceftriaxone sebagai kontrol positif dan aquadest sebagai kontrol negatif. Jumlah pengulangan didapatkan dengan menggunakan rumus: $(n-1) \times (t-1) \geq 15$.

$$(n-1) \times (t-1) \geq 15$$

$$(n-1) \times (6-1) \geq 15$$

$$(n-1) \times 5 \geq 15$$

$$5n-5 \geq 15$$

$$5n \geq 20$$

$$n \geq 4 \text{ (pengulangan dilakukan 4 kali dalam pembuatan)}$$

3.6. Alat dan Bahan Penelitian

3.6.1 Alat :

- | | |
|-----------------------|--------------------|
| 1. Gelas ukur | 15. Mikroskop |
| 2. Erlenmeyer | 16. Kain lap |
| 3. Tabung reaksi | 17. Kertas saring |
| 4. Timbangan analitik | 18. Jangka sorong |
| 5. Beaker gelas | 19. Aluminium foil |
| 6. Rotary evaporator | 20. Kertas label |
| 7. Autoklaf | 21. Spiritus |
| 8. Oven | 22. Bunsen |
| 9. Pipet mikro | 23. Cotton bud |
| 10. Laminar Air Flow | 24. Kapas |
| 11. Jarum ose | 25. Spidol |
| 12. Cawan petri | 26. Plastik |
| 13. Pinset | 27. Inkubator |
| 14. Kertas tisu | |

3.6.2 Bahan:

1. Etanol 70%
2. Alkohol 70%,

3. DMSO 10%
4. Ekstrak kulit buah alpukat
5. Larutan Mc Farland
6. Media Mueller Hinton Agar
7. Aquadest
8. Biakan bakteri *Staphylococcus aureus*
9. Sediaan ceftriaxone 1 ampul

3.7. Prosedur Kerja

3.7.1. Pengambilan dan Pengolahan Sampel

Sampel kulit buah alpukat yang digunakan dalam penelitian ini, diperoleh dari daerah Medan. Kulit buah alpukat terlebih dulu dipisahkan dari buah dan bijinya. Kulit buah alpukat yang sudah terpisah lalu disortasi dan dicuci kemudian langsung dikeringkan di bawah sinar matahari. Kulit buah alpukat yang sudah kering, dihaluskan dengan blender dan diayak menggunakan mesh 60. Sampel kulit buah alpukat yang diperoleh adalah dalam bentuk serbuk simplisia.

3.7.2. Sterilisasi Media

Seluruh alat yang digunakan dalam menguji efektivitas antibakteri disterilkan terlebih dahulu sebelum digunakan. Alat-alat yang disterilkan dibungkus dengan menggunakan kertas dan dimasukkan ke dalam autoklaf dengan suhu 121°C selama 15-30 menit.

3.7.3. Pembuatan Simplisia

Serbuk simplisia kulit buah alpukat sebanyak 200 gram diekstraksi dengan metode maserasi menggunakan 2 liter cairan etanol 70%. Maserasi dilakukan selama tiga kali 24 jam dengan tiga pergantian pelarut dalam maserator. Untuk mendapatkan hasil ekstrak yang kental dalam suhu dingin dan tidak dapat dituang, ekstrak dipekatkan menggunakan *rotary evaporator* dengan suhu 40-50°C.

3.7.4. Pembuatan Larutan Uji Berbagai Konsentrasi

$$100\% = \frac{100g}{100ml} = 100 \text{ gram ekstrak dalam } 100 \text{ mL pelarut} = 1 \text{ gram/mL}$$

$$75\% = \frac{75g}{100ml} = 75 \text{ gram ekstrak dalam } 100 \text{ mL pelarut} = 0,75 \text{ gram/mL}$$

$$50\% = \frac{50g}{100ml} = 50 \text{ gram ekstrak dalam } 100 \text{ mL pelarut} = 0,5 \text{ gram/mL}$$

$$25\% = \frac{25g}{100ml} = 25 \text{ gram ekstrak dalam } 100 \text{ mL pelarut} = 0,25 \text{ gram/mL}$$

3.7.5. Pembuatan Mueller Hinton Agar (MHA)

Sebanyak 20 gram bahan media MHA dilarutkan dengan menggunakan aquadest sebanyak 500 mL di dalam labu Erlenmeyer, lalu letakkan di atas *hot plate* dan diaduk menggunakan *magnetic stirrer*. Setelah mendidih, lalu ditutup dengan kapas dan aluminium foil. Media MHA kemudian disterilkan dalam autoklaf dengan suhu 121°C selama 15 menit. Media MHA dituang ke dalam cawan petri kira-kira 20 mL dan ditunggu hingga memadat.

3.7.6. Penanaman Bakteri *Staphylococcus aureus*

Suspensi bakteri *Staphylococcus aureus* diambil dengan jarum ose steril lalu ditanam pada media MHA dengan cara menggores. Bakteri kemudian diinokulasikan pada suhu 37°C selama 18-24 jam.

3.7.7. Uji Antibakteri

Bakteri *Staphylococcus aureus* diambil dari medium agar padat menggunakan jarum ose, lalu membuat suspensi dalam tabung dengan NaCl 0,9%. Kekeruhan dibandingkan dengan larutan Mc Farland 0,5. Suspensi bakteri kemudian diambil. Lidi kapas kemudian diangkat dan diperas dengan menekan lidi kapas pada dinding tabung sambil diputar-putar. Lidi kapas lalu diswabkan ke permukaan medium MHA sehingga seluruh permukaan tertutup rapat supaya bakteri meresap ke dalam media agar.

Pengujian dilakukan dengan teknik difusi cakram. Cakram yang kosong direndam dalam ekstrak kulit buah alpukat dengan konsentrasi 25%, 50%, 75%, 100%, ceftriaxone dan aquadest. Jarak antara cakram kurang lebih 20 mm. Setiap cakram yang telah direndam dalam ekstrak kulit buah alpukat dengan berbagai konsentrasi kemudian ditempelkan pada media MHA yang sudah ditanamkan bakteri *Staphylococcus aureus*. Proses selanjutnya ialah inkubasi dalam inkubator dengan suhu 36-37°C selama 24 jam.

Terbentuknya zona hambat menunjukkan terdapatnya efektivitas anti bakteri ekstrak kulit buah alpukat terhadap *Staphylococcus aureus*. Luas zona hambat

diukur dengan mengukur *clear zone* di sekitar kertas cakram menggunakan jangka sorong dengan ketelitian 0,01 mm.

3.8. Identifikasi Variabel

3.8.1. Variabel Independen

Ekstrak kulit buah alpukat dengan konsentrasi 25%, 50%, 75% dan 100%.

3.8.2. Variabel Dependen

Zona hambat ekstrak kulit buah alpukat terhadap bakteri.

3.9. Defenisi Operasional

Tabel 3. 1. Defenisi Operasional

No.	Variabel	Definisi Operasional	Alat Ukur	Cara Ukur	Hasil Ukur	Skala Pengukuran
1	Ekstrak kulit buah alpukat	Sediaan zat aktif yang diperoleh dengan mengekstrak simplisia kulit buah alpukat	Gelas ukur, mikropipet, timbangan.	Pengenceran untuk mendapatkan konsentrasi 25%, 50%, 75% dan 100%	Sesuai dengan konsentrasi	Interval
2	Zona hambat bakteri <i>Staphylococcus aureus</i>	Daerah di sekitar kertas cakram yang tidak ditemukan pertumbuhan <i>Staphylococcus aureus</i>	Jangka sorong	Mengukur di kertas cakram	Diameter zona hambat (mm). - kuat : > 20 mm - sedang : 16-20 mm - lemah : 10-15 mm - tidak ada : <10 mm	Rasio

3.10. Analisis Data

Data dalam penelitian ini dianalisis menggunakan metode statistik. Pada uji statistik kulit buah alpukat didapatkan data terdistribusi dengan normal pada uji normalitas Shapiro-wilk, dimana nilai signifikannya $p > 0,05$. Pengujian selanjutnya yaitu uji homogenitas varian datanya dan didapatkan hasil $p = 0,68 > 0,05$, sehingga dapat disimpulkan bahwa data dalam penelitian ini homogen. Pengujian selanjutnya ialah uji One Way Anova dan dilanjutkan dengan uji Post Hoc LSD (*Least Significant Different*) untuk melihat perbedaan yang signifikan antar perlakuan pada penelitian ini.

