

Kajian Kliniko-patologik dan Antimikroba Ekstrak Biji Alpukat (*Persea Americana Mill*)

Clinicopathology and Antimicrobial Study of Avocado Seed Extract (Persea americana Mill)

Christin Marganingsih Santosa*, Imron Rosyadi, Dinar Arifianto, Siti Isrina Oktavia Salasia

Departemen Patologi Klinik, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Gadjah Mada,
Jl. Fauna 2, Karangmalang, Yogyakarta 55281

*Email: jchrist@ugm.ac.id

Naskah diterima: 3 November 2018, direvisi: 9 November 2018, disetujui: 30 November 2019

Abstract

The phytochemical components of avocado seeds (*Persea americana Mill*) consist of alkaloids, flavonoids, tannins, and saponins, that have the potential as antibacterials. This study was aimed to determine the ability of *Persea americana Mill* extract to inhibit the growth of *Staphylococcus aureus* through inhibition zone observation and the ability to accelerate wound healing of skin infected by *S. aureus* through observation of wound closure and cytopathology. *Persea americana Mill* was extracted using the maceration method with 70% ethanol. The activities of this extract were tested by the diffusion disc agar method. Biomedical tests were carried out on anesthetic Wistar rats with the skin wounds infected by *S. aureus* and treated with *Persea americana Mill* extract. Based on the results of the antimicrobial test, avocado seed extract has an inhibitory effect on the growth of *S. aureus* at a concentration of 6.25% and best at a concentration of 100% compared to the control. Tests in experimental rats showed the effect of wound healing on the 2nd day after giving the extract *Persea americana Mill* ointment, faster than the control, which was need 4 days of wound closure. Cytopathology results showed that leukocyte activity was more prominent in rats treated with avocado seed extract compared to control rats. Avocado seeds as by-products have the potential to be new herbal medicines that can be used as antimicrobials of *S. aureus*, which have been confirmed to be resistant to various antibiotics.

Key words: antimicrobial; cytopathology; *Persea americana Mill*; resistant; *Staphylococcus aureus*

Abstrak

Komponen fitokimia dari biji buah alpukat (*Persea americana Mill*) terdiri dari golongan alkaloid, flavonoid, tanin, dan saponin, mempunyai potensi sebagai antibakteri. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui kemampuan ekstrak *Persea americana Mill* dalam menghambat pertumbuhan *Staphylococcus aureus* melalui pengamatan zona hambat serta kemampuan menyembuhkan luka yang terinfeksi *S. aureus* melalui pengamatan penutupan luka dan sitopatologi. Proses penarikan senyawa fitokimia dalam biji buah alpukat menggunakan metode maserasi dengan etanol 70%. Hasil ekstrak diujikan pada mikrobia uji melalui metode difusi agar. Uji biomedik dilakukan pada tikus Wistar teranastesi yang dibuat luka terinfeksi *S. aureus* dan diobati salep ekstrak *Persea americana Mill*. Berdasar hasil uji antimikroba, ekstrak biji alpukat mempunyai efek hambatan pada pertumbuhan *S. aureus* pada konsentrasi 6,25% dan terbaik pada konsentrasi 100% dibandingkan dengan kontrol. Uji pada tikus percobaan, menunjukkan efek kesembuhan luka pada hari ke-2 setelah pemberian ekstrak, lebih cepat dibanding kontrol yaitu hari ke-4 penutupan luka. Hasil sitopatologi menunjukkan aktivitas leukosit yang lebih meningkat pada tikus yang diobati ekstrak biji alpukat dibandingkan dengan tikus kontrol. Biji buah alpukat sebagai hasil samping/buangan produk buah alpukat berpotensi sebagai obat herbal baru yang dapat dimanfaatkan untuk mengatasi infeksi *S. aureus* yang telah dikonfirmasi resisten terhadap berbagai antibiotika.

Kata kunci: *Persea americana Mill*; *Staphylococcus aureus*; resisten; antimikroba; sitopatologi

Pendahuluan

Buah alpukat (*Persea americana* Mill) sudah sangat dikenal masyarakat Indonesia baik untuk dimakan langsung, dibuat jus buah atau bahkan dipakai campuran masker wajah. Kandungan lemak buah alpukat 20 – 30 kali lebih banyak dibanding buah lainnya dan termasuk lemak tak jenuh sehingga mudah dicerna. Biji buah alpukat pada umumnya tidak dimanfaatkan dan hanya sebagai limbah buangan. Namun dari pemeriksaan kandungan nutrisi dalam satu biji buah *Persea americana* Mill terdapat fosfor (95 mg), kalsium (23 mg), zat besi (1,4 mg), sodium (9 mg), potassium (1,3 mg), niacin (8,6 mg), vitamin A (660 I.U.), dan vitamin C (82 mg). Komponen fitokimia biji buah terdiri dari saponin, alkaloid, tannin, triterpenoid dan flavonoid (Marlinda dkk., 2012; Samsiati, 2016) yang juga berpotensi memiliki aktivitas antibakteri (Chia and Dykes, 2010; Leite *et al.*, 2009) dan antikanker (Widiyastuti, 2017).

Staphylococcus aureus merupakan agen utama penyebab mastitis baik subklinis atau kronis pada ternak perah yang menyebabkan kerugian yang cukup signifikan bagi para peternak dan pada industri susu. Infeksi *S. aureus* pada hewan dan manusia terutama *methicillin resistant S. aureus* (MRSA) merupakan penyakit yang sulit untuk diatasi karena mikroba ini diketahui telah resisten terhadap berbagai antibiotika (Azis dkk., 2016; Widianingrum *et al.*, 2016).

Studi mengenai potensi ekstrak biji buah alpukat (*Persea americana* Mill) sebagai antimikroba terutama *S. aureus* resisten antibiotika dan efek kliniko patologisnya merupakan suatu upaya mencari alternatif antimikroba baru. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui kemampuan ekstrak etanol biji buah *Persea americana* Mill dalam menghambat pertumbuhan *Staphylococcus aureus in vitro* serta potensinya dalam mempercepat kesembuhan luka yang terinfeksi *S. aureus* secara *in vivo*. Diharapkan penelitian ini dapat bermanfaat untuk memperkaya wawasan obat herbal Indonesia khususnya mengatasi infeksi akibat *S. aureus* multiresisten antibiotika secara efektif.

Materi dan Metode

Pembuatan ekstrak etanol biji buah alpukat

Biji alpukat (*Persea americana* Mill) dipilih yang diperoleh dari Sleman, Yogyakarta adalah buah yang

sudah matang siap dikonsumsi. Biji alpukat dipotong kecil-kecil dengan ukuran sekitar 1 cm², dikeringkan dalam oven selama 1 jam, kemudian dihaluskan. Selanjutnya serbuk kering *Persea americana* Mill diekstraksi menggunakan etanol 70% dengan metode maserasi di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Gadjah Mada. Hasil ekstrak dipekatkan menjadi bentuk pasta dengan cara mencampurkan ekstrak dengan vaseline 1:10 untuk digunakan uji selanjutnya.

Isolat

Isolat *Staphylococcus aureus* berasal dari susu sapi mastitis, merupakan koleksi dari Prof. Dr. drh. Siti Isrina Oktavia Salasia, Departemen Patologi Klinik FKH UGM.

Uji kepekaan antibiotika

Uji ini memerlukan persiapan inokulum yaitu biakan murni dan membuat inokulum standar. Empat sampai enam koloni berusia 16 sampai 24 jam dipilih dari media agar dan dibuat suspensi dengan NaCl 0,85% untuk mendapatkan suspensi, dibandingkan dengan suspensi standar Mc Farland. Standar kekeruhan 0,5 Mc Farland telah tersedia secara komersial, yang memiliki kekeruhan sebanding dengan 1 x 10⁸ colony forming unit (CFU)/ml.

Uji sensitifitas antibiotika digunakan metode difusi cakram dalam media agar *Mueller Hinton* (Oxoid™) (MHA) yang mengandung *S. aureus*, dengan menempelkan lempengan diskus antibiotika (Oxoid™). Antibiotika yang digunakan untuk uji resistensi *S. aureus* yaitu: Oxacillin, Cefoxitin, Tetrasiklin, Eritromisin, Penisilin-G, Ampisilin, dan Gentamisin. Media MHA kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Zona inhibisi yang terbentuk dievaluasi sesuai standar zona hambatan Kirby-Bauer.

Uji antibakterial ekstrak *Persea americana* Mill

Pengujian aktivitas antibakteri secara *in vitro* dilakukan dengan menggunakan metode difusi cakram (Valgas *et al.*, 2007) dengan antibiotika pembanding yaitu ampisilin dan gentamicin. Biakan murni *Staphylococcus aureus* distandarisasi dengan larutan 0,5 Mc Farland sehingga diperoleh biakan bakteri uji dengan kepadatan mikroba sebanyak 1x10⁸ CFU/mL. Larutan biakan dipupukkan pada MHA selanjutnya ditempelkan kertas cakram berisi ekstrak *Persea americana* Mill dengan konsentrasi bertingkat (6,25%,

12,5%, 25%, 50% dan 100%) (Hando, 2017 dengan modifikasi), diinkubasi pada suhu 35°C selama 24 jam. Diameter zona hambat pertumbuhan bakteri uji diukur menggunakan jangka sorong dan dievaluasi sesuai standar zona hambatan *Kirby-Bauer*.

Uji pada hewan percobaan

Dalam uji *in vivo* digunakan tikus Wistar jantan 25 ekor, umur 3 bulan, berat badan rata-rata 130 – 150 gram. Tikus dibagi secara acak menjadi 5 kelompok masing masing terdiri dari 5 ekor tikus. Semua kelompok dibuat *incisi* didaerah punggung sepanjang 1 cm sampai dermis, dibawah pengaruh anestesi Ketamin HCl 75 – 95 mg/kg BB (Carpenter, 2013). Kelompok I adalah tikus kontrol (tidak diberi perlakuan). Kelompok II sampai kelompok V tikus diinfeksi *S. aureus* 1x10⁸ CFU/mL intradermal pada lokasi luka. Selanjutnya Kelompok II diberi salep antibiotik komersial yang mengandung ampicillin pada hari ke-1 sampai akhir penelitian (hari ke 7). Kelompok III diberi ekstrak *Persea americana* Mill dosis 1 (berdasar uji *in vitro* yang diukur/25%). Kelompok IV diberi ekstrak *Persea americana* Mill dosis 2 (berdasar uji *in vitro* yang diukur/50%). Kelompok V diberi ekstrak *Persea americana* Mill dosis 3 (berdasar uji *in vitro* yang diukur/100%) hingga akhir penelitian (hari ke-7). Masing-masing tikus ditempatkan dalam kandang individu.

Pengambilan darah dilakukan pada awal (sebelum perlakuan) dan akhir penelitian (hari ke-7) melalui *plexus retroorbitalis* untuk diperiksa hematologi. Pada akhir penelitian dilakukan uji imunitas seluler meliputi pemeriksaan leukosit, diferensial leukosit dan sitopatologi luka infeksi. Tikus kemudian dieutanasi menggunakan Ketamin 300 mg/kg berat badan secara intramuskular. Penggunaan hewan percobaan telah mendapatkan kelaikan etik dengan No. 0023/EC-FKH/Int./2018.

Pemeriksaan sitopatologi

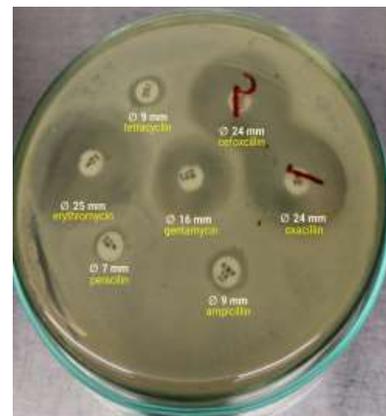
Kaca obyek ditempelkan pada tempat luka infeksi, apus luka selanjutnya diwarnai dengan Giemsa dan diamati di bawah mikroskop. Jenis sel imun seluler diamati sebagai indikator respon terhadap peradangan akibat infeksi *S. aureus*.

Hasil dan Pembahasan

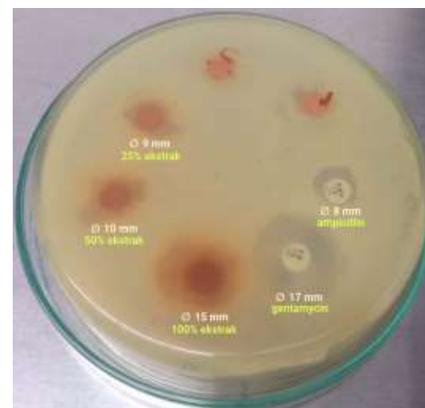
Uji resistensi *Staphylococcus aureus* terhadap berbagai antibiotika dapat dilihat pada Gambar 1. Dari

hasil uji resistensi tampak bahwa *S. aureus* masih peka/sensitif terhadap erythromycin, oxacillin, cefoxitin dan gentamycin, sedangkan terhadap ampicillin, tetracycline dan penicillin-G sudah mengalami resisten. *Staphylococcus aureus* isolat asal Indonesia diketahui telah resisten terhadap berbagai antibiotika (Salasia dan Khusnan, 2011; Azis dkk., 2016; Widianingrum et al., 2016).

Kemampuan ekstrak *Persea americana* Mill dalam menghambat pertumbuhan *Staphylococcus aureus* diamati melalui zona hambat yang terbentuk dari cakram diskus yang ditempelkan pada pelat agar Mueller Hinton (MHA) (Balouiri et al., 2016). Ekstrak *Persea Americana* Mill dilakukan uji menggunakan



Gambar 1. Uji aktivitas antimikroba berbagai jenis antibiotika sesuai metode *Kirby Bauer*, memperlihatkan *S. aureus* telah resisten terhadap penicillin, tetracyclin dan ampicillin.



Gambar 2. Uji aktivitas antimikroba ekstrak etanol biji buah alpukat (*Persea Americana* Mill.) dengan serial konsentrasi 6,25%, 12,5%, 25%, 50%, dan 100%, menunjukkan potensi hambatan terhadap pertumbuhan *S. aureus* dengan zona hambat berturut-turut sebesar 9 mm, 9 mm, 9 mm, 10 mm, dan 15 mm. Sebagai kontrol zona hambat ampicillin terhadap *S. aureus* sebesar 8 mm (resisten) dan gentamycin sebesar 17 mm (sensitif).

seri konsentrasi yaitu 6,25%, 12,5%, 25%, 50%, dan 100% (Hando, 2017 dengan modifikasi). Pengujian dilakukan dengan metode difusi cakram, dengan ampicillin dan gentamicin sebagai pembanding. Hasil penelitian menunjukkan adanya aktivitas antibakteri pada semua konsentrasi ekstrak, yang diketahui melalui zona hambat yang terbentuk.

Hasil pengujian aktivitas antimikroba ekstrak *Persea americana* Mill terhadap *Staphylococcus aureus* memperlihatkan diameter zona hambat untuk konsentrasi 6,25% adalah sebesar 9 mm, konsentrasi 12,5% memiliki diameter daya hambat sebesar 9 mm, konsentrasi 25% sebesar 9 mm, konsentrasi 50% sebesar 10 mm, dan konsentrasi 100% menunjukkan daya hambat 15 mm (Gambar 2). Antibiotika pembanding gentamycin menunjukkan diameter daya hambat 17 mm dan ampicillin 8 mm. Sesuai dengan metode interpretasi Kirby Bauer, hasil ini menunjukkan bahwa antibiotika gentamycin masih sensitif, sedangkan ampicillin telah resisten untuk *S. aureus*. Berdasarkan pembanding ampicillin (resisten dengan diameter hambat 8 mm), maka dapat diinterpretasikan bahwa *S. aureus* sensitif terhadap ekstrak *Persea Americana* Mill pada konsentrasi mulai 6,25% (dengan daya hambat > 8 mm) dan daya hambat tertinggi pada konsentrasi 100% (15 mm), mendekati sensitivitas gentamycin (dengan daya hambat 17 mm).

Berdasar hasil uji antimikrobal ekstrak biji Alpukat ini, dapat disimpulkan bahwa ekstrak biji *Persea Americana* Mill efektif digunakan untuk menghambat pertumbuhan *Staphylococcus aureus* yang telah resisten terhadap penicillin, tetracyclin dan ampicillin mulai konsentrasi 6,5%. Hasil penelitian ini memberi peluang besar dalam menangani infeksi *S. aureus* yang bersifat patogen dan telah mengalami *multi-drug resistant*. Tanaman herbal *Persea americana* Mill dapat dikembangkan sebagai alternatif obat baru dalam mengatasi *S. aureus* yang telah banyak dilaporkan resisten terhadap berbagai antibiotika. Berdasarkan hasil skrining fitokimia biji buah alpukat yang dilaporkan oleh Samsiati (2016) dan Marlinda dkk. (2012), diketahui bahwa biji alpukat mengandung beberapa senyawa, yaitu alkaloid, triterpenoid, tanin, flavonoid dan saponin. Kandungan biji Alpukat tersebut dilaporkan memiliki aktivitas antibakteri (Chia and Dykes, 2010; Leite *et al.*, 2009).

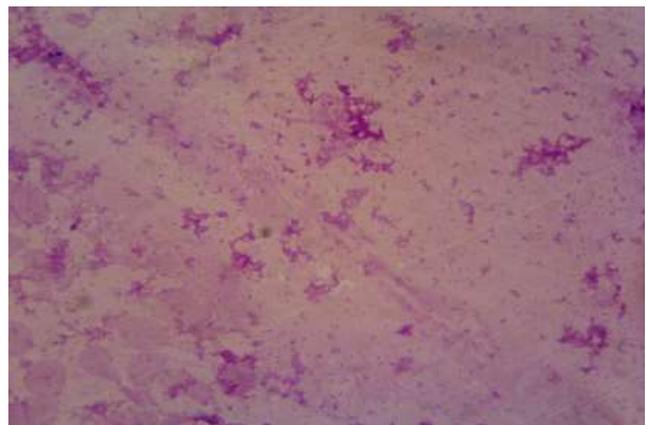
Secara *in vivo*, dilakukan uji biomedik pada tikus Wistar teranastesi yang dibuat luka dengan infeksi *S. aureus* dan diobati dengan salep ekstrak

Persea americana Mill. Pengamatan kesembuhan luka diamati melalui kecepatan penutupan luka dan sitopatologi. Uji pada tikus percobaan menunjukkan efek kesembuhan luka (penutupan luka) pada hari ke-2 pengobatan dengan salep ekstrak *Persea americana* Mill 100% (Gambar 3), lebih cepat dibanding dengan kontrol antibiotika dan kelompok yang diberi ekstrak 25% dan 50% yang baru terlihat proses kesembuhan pada hari ke-4.

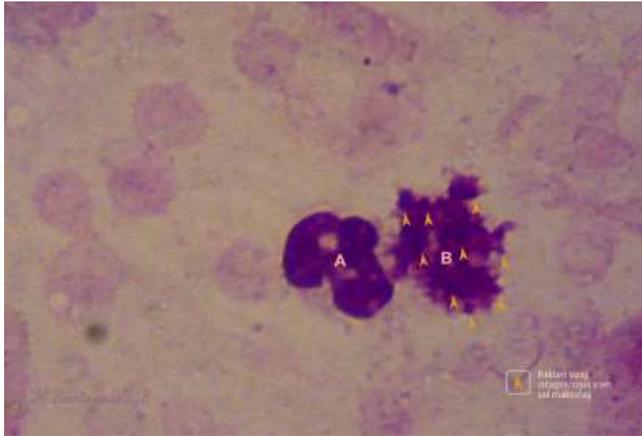
Hasil sitopatologi apus luka kulit menunjukkan adanya akumulasi sel-sel debris dan sisa radang karena infeksi *S. aureus* (Gambar 4). Aktifitas leukosit lebih meningkat pada luka tikus yang diobati ekstrak biji alpukat dibandingkan dengan tikus control. Pada apus luka infeksi kulit tikus yang diberi salep ekstrak alpukat 100%, tampak sel makrofag aktif memfagosit bakteri (Gambar 5). Banyaknya bakteri yang difagosit oleh sel makrofag memperlihatkan besarnya kemampuan ekstrak *Persea americana* Mill yang mengandung



Gambar 3. Pengamatan hari ke-2 proses penutupan luka insisi yang diinfeksi *S. aureus* intradermal kemudian diberi salep ekstrak *Persea Americana* Mill 100% secara topikal.



Gambar 4. Sitopatologi apus luka, banyak terdapat akumulasi debris dan sisa radang karena infeksi *S. aureus* (Pewarnaan Giemsa, perbesaran 10x100).



Gambar 5. Aktifitas leukosit lebih meningkat pada apus luka infeksi tikus yang diobati dengan ekstrak biji alpukat (100%). A: sel neutrofil, B: sel makrofag, Panah kecil: menunjukkan bakteri yang difagosit oleh sel makrofag (Pewarnaan Giemsa, perbesaran 10x100).

berbagai senyawa yang berperan sebagai antibacterial (Chia dan Dykes, 2010; Leite *et al.*, 2009) dalam membantu kesembuhan luka infeksi *S. aureus*.

Munculnya sel imun seluler yang tampak pada apus luka kulit memperlihatkan bahwa ekstrak *Persea americana* Mill mampu menyembuhkan luka tersebut melalui peningkatan aktivitas fagositosis bakteri oleh makrofag. Kandungan nutrisi dalam biji buah *Persea americana* Mill terdapat fosfor, kalsium, zat besi, sodium, potassium, niacin, vitamin A, dan vitamin C, dan berbagai senyawa antioksidan (Samsiati, 2016) kemungkinan berperan dalam proses penyembuhan luka. Chia dan Dykes (2010), melaporkan bahwa ekstrak etanol biji alpukat mampu menghambat pertumbuhan *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus*. Aktivitas antimicrobial kemungkinan melalui penghancuran mikroba oleh substansi aktif yang terkandung dalam alpukat (Karni *et al.*, 1988).

Kesimpulan

Berdasarkan hasil pengujian *in vitro* ekstrak biji alpukat (*Persea Americana* Mill.) mampu menghambat pertumbuhan *Staphylococcus aureus* yang telah multi resisten terhadap penicillin, tetracyclin dan ampicillin mulai konsentrasi 6,5%, dan hambatan tertinggi pada konsentrasi 100%. Secara *in vivo* pada tikus percobaan menunjukkan ekstrak biji alpukat (*Persea Americana* Mill.) mampu menyembuhkan luka infeksi *S. aureus*. Biji buah alpukat yang merupakan hasil samping/ buangan dari buah alpukat berpotensi sebagai obat herbal dalam mengatasi infeksi *S. aureus* yang telah dikonfirmasi resisten terhadap berbagai antibiotika.

Ucapan Terima Kasih

Penelitian ini merupakan sebagian penelitian yang didanai melalui Pengembangan Departemen FKH UGM Tahun 2018 berdasarkan Surat Perjanjian Pelaksanaan Kegiatan Nomor: 1029/J01.1.22/HK4/2018.

Daftar Pustaka

- Aziz, F., Lestari, F.B., Nuraidah, S., Purwati, E., dan Salasia, S.I.O. (2016). Deteksi Gen Penyandi Sifat Resistensi Metisilin, Penisilin dan Tetrasiklin pada Isolat *Staphylococcus aureus* asal Susu Mastitis Subklinis Sapi Perah. *Jurnal Sain Veteriner*. 34(1): 60 – 69.
- Balouiri, M., Sadiki, M., dan Ibn Souda, S.K. (2017). Methods for in Vitro Evaluating Antimicrobial Activity: A Review. *J of Pharmaceutical Analysis*. 6: 71 – 79.
- Carpenter, J.W. (2013). *Exotic Animal Formulary*. 4th edition. Elsevier Inc. Missouri.
- Chia, T.W.R., and Dykes, G.A., (2010). Antimicrobial Activity of Crude Epicarp and Seed Extracts from Mature Avocado Fruit (*Persea americana*) of Three Cultivars. *Pharmaceutical Biology*, 48(7): 753-756.
- Hando, E.K. (2017). Efek Rebusan Daun Alpukat (*Persea americana* Mill.) Terhadap Kemampuan Adhesi Bakteri *Streptococcus sanguinis* ATCC₁₀₅₅₆ in-Vitro. Skripsi. Fakultas Kedokteran Gigi. Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta. Indonesia.
- Karni, L., Prusky, D., Kobilier, I., Barshira, E., Kobilier, D., and Jacoby, B. (1988). Involvement of epicatechin in the regulation of the antifungal diene during reactivation of latent *Colletotrichum gloeosporioides* infection of avocado fruit. *Phytoparasitica*. 16: 92–92.
- Leite, J.J.G., Brito, E.H.S., Cordeiro, R.A., Brillhante, R.S.N., Sidrim, J.J.C., Bertini, L.M., Morais, S.M.D., and Rocha, M.F.G. (2009). Chemical Composition, Toxicity and Larvicidal and Antifungal Activities of *Persea americana* (Avocado) Seed Extract. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 2 (42):110-113.

- Marlinda, M., Sangia, M.S., and Wuntua, A.D. 2012. Analisis Senyawa Metabolit Sekunder dan Uji Toksisitas Ekstrak Etanol Biji Buah Alpukat (*Persea americana* Mill.); <http://ejournal.unsrat.ac.id/index.php/jmuo>.
- Salasia, S. I. O. and Khusnan (2011). Characteristics of *Staphylococcus aureus* isolates in Indonesia. The International Conference on Natural Sciences (ICONS), Humboldt College. Malang, July 9-11.
- Samsiati, E.H. (2016). Penentuan Aktivitas dan Identifikasi Senyawa Aktif Antioksidan Dalam Biji Buah Alpukat. Tesis *Postgraduate*. Fakultas Farmasi. Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta. Indonesia.
- Valgas, C., Souza, S.M.d., Smânia, E.F., and Smânia Jr, A. (2007). Screening methods to determine antibacterial activity of natural products. *Brazilian Journal of Microbiology*. 38(2), 369-380.
- Widiyastuti, Y. (2017). Kajian Senyawa Berpotensi Antikanker Biji Alpukat (*Persea Americana* Mill.): Isolasi Senyawa Sitotoksik dan Mekanisme Kerja Terhadap Sel Kanker MCF-7. Disertasi. Fakultas Farmasi. Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta. Indonesia.
- Widaningrum, D. C., Windria, S. and Salasia, S.I.O. (2016). Antibiotic Resistance and Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* Isolated from Bovine, Crossbred Etawa Goat and Human. *Asian J. Anim. Vet. Adv.* 11 (2): 122-129.