

repository.ub.ac.id

**EFEK TERAPI EKSTRAK ETANOL DAUN BELUNTAS
(*Pluchea indica* L) PADA MENCIT (*Mus musculus*)
MASTITIS SUBKLINIS HASIL INDUKSI
Staphylococcus aureus PEMBENTUK
BIOFILM TERHADAP PRODUKSI
CD4 DAN CD8 PADA
ORGAN LIMPA**

SKRIPSI

Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Kedokteran Hewan

Oleh :

AHYA NUR AFIDA ALFARID
NIM. 125130107111020



**PROGRAM STUDI PENDIDIKAN HEWAN
FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2018**



LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI

Efek Terapi Ekstrak Etanol Daun Beluntas (*Pluchea indica L*) pada Mencit (*Mus musculus*) Mastitis Subklinis Hasil Induksi *Staphylococcus aureus* Pembentuk Biofilm Terhadap Produksi CD4 dan CD8 Pada Organ Limpa

Oleh :

**AHYA NUR AFIDA ALFARID
NIM. 125130107111020**

Setelah dipertahankan didepan majelis penguji
pada tanggal 8 Agustus 2018
dan dinyatakan memenuhi syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Kedokteran Hewan

Menyetujui,

Dosen Pembimbing I

Dosen Pembimbing II

Dr. Sri Murwani, drh., MP
NIP. 19630101 198903 2 001

drh. Fajar Shodiq Permata, M.Biotech
NIP. 19870501 201504 1 001

**Mengetahui,
Dekan Fakultas Kedokteran Hewan
Universitas Brawijaya**

Prof. Dr. Aulanni'am, drh., DES
NIP. 19600903 198802 2 001



LEMBAR PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini :

Nama : Ahya Nur Afida Alfarid

NIM : 125130107111020

Program Studi : Pendidikan Dokter Hewan

Penulis Skripsi berjudul : Efek Terapi Ekstrak Etanol Daun Beluntas (*Pluchea indica L*) pada Mencit (*Mus musculus*) Mastitis Subklinis Hasil Induksi *Staphylococcus aureus* Pembentuk Biofilm Terhadap Produksi CD4 Dan CD8 pada Organ Limpa

Dengan ini menyatakan bahwa:

1. Isi dari proposal skripsi yang saya buat adalah benar-benar karya saya sendiri dan tidak menjiplak karya orang lain atau plagiat, selain nama-nama yang termaktub di isi dan tertulis di daftar pustaka dalam skripsi ini.
2. Apabila dikemudian hari ternyata proposal skripsi yang saya tulis terbukti hasil jiplakan, maka saya akan bersedia menanggung segala resiko yang akan saya terima.

Demikian pernyataan ini dibuat dengan segala kesadaran.

Malang, 10 Juli 2018
Yang menyatakan,

Ahya Nur Afida AlFarid
NIM. 125130107111020

Efek Terapi Ekstrak Etanol Daun Beluntas (*Pluchea indica L*) pada Mencit (*Mus musculus*) Mastitis Subklinis Hasil Induksi *Staphylococcus aureus* Pembentuk Biofilm Terhadap Produksi CD4 dan CD8 pada Organ Limpa

ABSTRAK

Bakteri *Staphylococcus aureus* merupakan patogen gram-positif yang dapat menyebabkan mastitis pada sapi. Mastitis secara umum didefinisikan sebagai peradangan jaringan internal kelenjar ambing yang disertai perubahan fisik, kimia, mikrobiologi, ditemukannya bakteri patogen dan adanya kenaikan jumlah sel radang. Kemampuan *S. aureus* dalam membentuk biofilm menyebabkan bakteri tersebut resisten terhadap antibiotik dan dapat menimbulkan residu antibiotik pada susu. Daun beluntas (*Pluchea indica L.*) mengandung flavonoid dan tanin yang memiliki aktivitas antibakteri, antibiofilm, antiinflamasi dan antioksidan. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh ekstrak etanol daun beluntas (*Pluchea indica L.*) terhadap ekspresi CD-4 dan CD-8 pada mencit (*Mus musculus*) model mastitis. Penelitian ini merupakan studi eksperimental, *post-test control design only* menggunakan Rancangan Acak Lengkap. Mencit (*Mus musculus*) yang digunakan adalah mencit laktasi hari ke 12 dengan berat ± 25 gram yang terdiri dari 5 kelompok percobaan yaitu kelompok kontrol negatif (tidak diinjeksi bakteri dan tidak diterapi), kelompok kontrol positif (diinjeksi *Staphylococcus aureus* tanpa diterapi), kelompok perlakuan dosis terapi bertingkat yaitu 2,625 mg/25 gram, 26,25 mg/25 gram dan 52,5 mg/25 gram. Parameter yang dilihat adalah produksi CD-4 dan CD-8 dengan flowcytometry dan dianalisa secara statistik *one-way ANOVA* dengan uji lanjutan BNJ $\alpha = 0,05$. Hasil penelitian menunjukkan terjadinya penurunan jumlah sel yang mengekspresikan CD4 dan CD8 yang berkelanjutan sesuai dengan jumlah terapi ekstrak etanol daun beluntas. Simpulan dari penelitian ini yaitu ekstrak etanol daun beluntas (*Pluchea Indica L*) dapat menurunkan mastitis ditandai dengan penurunan ekspresi CD4 dan CD8 pada mencit (*Mus musculus*) mastitis subklinis dengan dosis terbaik yaitu 52/25 gram BB mencit.

Kata kunci : Daun Beluntas, Mastitis, *Staphylococcus aureus*, CD-4 dan CD-8

Therapy Effect of Beluntas Leaf Ethanol Extract (*Pluchea indica L*) on Mice (*Mus musculus*) Subclinical Mastitis Induction Results of *Staphylococcus aureus* Biofilm Makers against Production of CD4 and CD8 Pada Organ Limpa

ABSTRACT

Staphylococcus aureus is a gram-positive pathogen that can cause mastitis in cows. Mastitis is generally defined as inflammation of the internal tissues of the udder gland accompanied by physical, chemical, microbiological changes, the discovery of pathogenic bacteria and an increase in the number of inflammatory cells. The ability of *S. aureus* in forming biofilms causes these bacteria to be resistant to antibiotics and can cause antibiotic residues in milk. Beluntas leaf (*Pluchea indica L.*) contains flavonoids and tannins that have antibacterial, antibiofilm, anti-inflammatory and antioxidant activity. This study in to determine the effect of ethanol extract of beluntas leaf (*Pluchea indica L.*) to CD-4 and CD-8 expression in mouse (*Mus musculus*) mastitis model. This study was an experimental study, post-test control design only using Completely Randomized Design. Mice (*Mus musculus*) used were mice of lactation on day 12 with weight ± 25 gram consisting of 5 experimental group that were negative controled group (not injected bacteria and not treated), positive control group (injection of *S. aureus* without treatment), treatment with dose of multilevel therapy 2,625 mg / 25 gram, 26,25 mg / 25 gram and 52,5 mg / 25 gram. The parameters were CD-4 and CD-8 production with *flowcytometry* and statistically analyzed one-way ANOVA with BNJ $\alpha = 0.05$. The results showed that CD4 and CD8 counts were consistent with the amount of ethanol extract therapy of leaves beluntas. Conclusion of this research was extract etanol leaved beluntas (*Pluchea Indica L*) can decrease mastitis by lowering CD4 and CD8 in mice (*Mus musculus*) subklinis mastitis with best dose is 52/ 25 gram BB mice.

Keywords: Beluntas Leaves, Mastitis, *Staphylococcus aureus*, CD-4 and CD-8

KATA PENGANTAR

Puji syukur alhamdulillah penulis haturkan kehadiran Tuhan Yang Maha Esa karena atas limpahan rahmat, hidayah dan pertolongan-Nya lah sehingga penulis mampu menyelesaikan serangkaian tugas akhir skripsi yang berjudul “Efek Terapi Ekstrak Etanol Daun Beluntas (*Pluchea indica* L) pada Mencit Mastitis Subklinis Hasil Induksi *Staphylococcus aureus* Pembentuk Biofilm Terhadap Produksi sel T CD4 dan sel T CD8 pada Organ Limpa” dengan lancar.

Selama proses penulisan dan penyusunan skripsi ini penulis banyak mendapat bantuan dari berbagai pihak. Oleh karena itu, penulis ingin mengucapkan terima kasih kepada:

1. Dr. Sri Murwani, drh. MP selaku pembimbing I dan drh Fajar Shodiq Permata M.biomed selaku pembimbing II yang telah banyak memberikan bimbingan, nasehat, arahan, serta saran kepada penulis.
2. drh. Indah Amalia A, M.Sc dan Ibu Dhita Evi Aryani, S.Farm, Apt selaku dosen penguji atas saran yang diberikan.
3. Prof. Dr. Aulani'am, drh., DES selaku Dekan Fakultas Kedokteran Hewan yang selalu memberikan dukungan tiada henti demi kemajuan FKH UB.
4. Secara khusus kepada H Lukman Hakim dan Hj Bibit Ariani, Kakak Aniq Nur Mufida Ilma, Adik Aqna Nur Hilmi Mubarak serta keluarga besar
5. BIOFILM team yaitu Dhia Indah Fitri, Alfrida Riski AP Sulthon NR dan Ahya Nur Afida yang selalu ada dalam kondisi apapun.
6. Seluruh staf laboratorium mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya atas bantuan dan kerjasama yang telah diberikan selama penulis melakukan penelitian.
7. Keluarga besar *Class Be the Best* atas cinta, persahabatan, semangat, inspirasi, keceriaan dan mimpi-mimpi yang luar biasa.
8. Serta kepada semua pihak yang telah membantu dalam pelaksanaan dan penyusunan laporan ini yang tidak dapat penulis sebutkan satu persatu.

Penulis sangat menyadari bahwa skripsi ini masih banyak kekurangan, oleh karena itu penulis sangat mengharapkan adanya saran maupun kritik yang sifatnya membangun atas tulisan ini. Dan penulis amat berharap skripsi ini dapat bermanfaat kiranya baik untuk penulis maupun pembaca.

Malang, 20 Januari 2018

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
COVER	i
LEMBAR PENGESAHAN	ii
LEMBAR PERNYATAAN	iii
ABSTRAK	iv
ABSTRACT	v
KATA PENGANTAR	vi
DAFTAR ISI	vii
DAFTAR GAMBAR	ix
DAFTAR LAMPIRAN	x
DAFTAR SINGKATAN	xi
BAB 1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	4
1.3 Batasan Masalah	4
1.4 Tujuan	5
1.5 Manfaat	5
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA	6
2.1 Mastitis	6
2.1.1 Mastitis Subklinis	7
2.2 Tanaman Beluntas (<i>Pluchea indica L</i>)	8
2.2.1 Klasifikasi	8
2.2.2 Morfologi dan Karakteristik	8
2.2.3 Kandungan dan Manfaat	10
2.3 <i>Staphylococcus aureus</i>	13
2.3.1 Klasifikasi	12
2.3.2 Morfologi dan Karakteristik	12
2.3.3 Identifikasi <i>S. aureus</i>	13
2.3.4 Patogenesis	14
2.4 Biofilm	15
2.5 Imunitas Terhadap Mastitis	16
2.5.1 Sel CD4	16
2.5.2 Sel CD8	17
2.6 Mencit (<i>Mus musculus</i>)	17
BAB 3. KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS	20
3.1 Kerangka Konseptual	20
3.2 Hipotesis	23
BAB 4. METODOLOGI PENELITIAN	24
4.1 Tempat Dan Waktu	24
4.2 Populasi dan Sampel	24
4.2.1 Populasi	24
4.2.2 Sampel	24
4.3 Perhitungan Sampel	25
4.4 Rancangan Penelitian	26



4.5 Variabel Penelitian	26
4.6 Materi Penelitian	26
4.6.1 Bahan Penelitian.....	27
4.6.2 Alat Penelitian.....	28
4.7 Cara Kerja Penelitian	28
4.7.1 Persiapan Hewan Coba	28
4.7.2 Pembuatan Mencit Betina Bunting	29
4.7.3 Pembuatan Hewan Model Mastitis	29
4.7.4 Pra Penelitian	30
4.7.5 Pembuatan Ekstrak Etanol daun Beluntas.....	30
4.7.6 Dosis ekstrak etanol daun beluntas	30
4.7.7 Pemberian Ekstrak Etanol daun beluntas	31
pada tikus model mastitis	
4.7.8 Preparasi Organ Limpa.....	31
4.7.9 <i>Flowcytometry</i>	31
4.8 Analisa Data	32
BAB 5. HASIL DAN PEMBAHASAN	33
5.1 Pemeriksaan Mastitis Subklinis	33
5.2 Ekspresi Sel T CD4 Terapi Ekstrak Etanol Daun Beluntas	35
Mencit (<i>Mus musculus</i>) Mastitis Subklinis Hasil Injeksi <i>S. aureus</i>	
5.3 Ekspresi Sel T CD8 Terapi Ekstrak Etanol Daun Beluntas	41
Mencit (<i>Mus musculus</i>) Mastitis Subklinis Hasil Injeksi <i>S. aureus</i>	
BAB 5. PENUTUP	49
6.1 Kesimpulan	49
6.2 Saran.....	49
DAFTAR PUSTAKA	50
LAMPIRAN	54

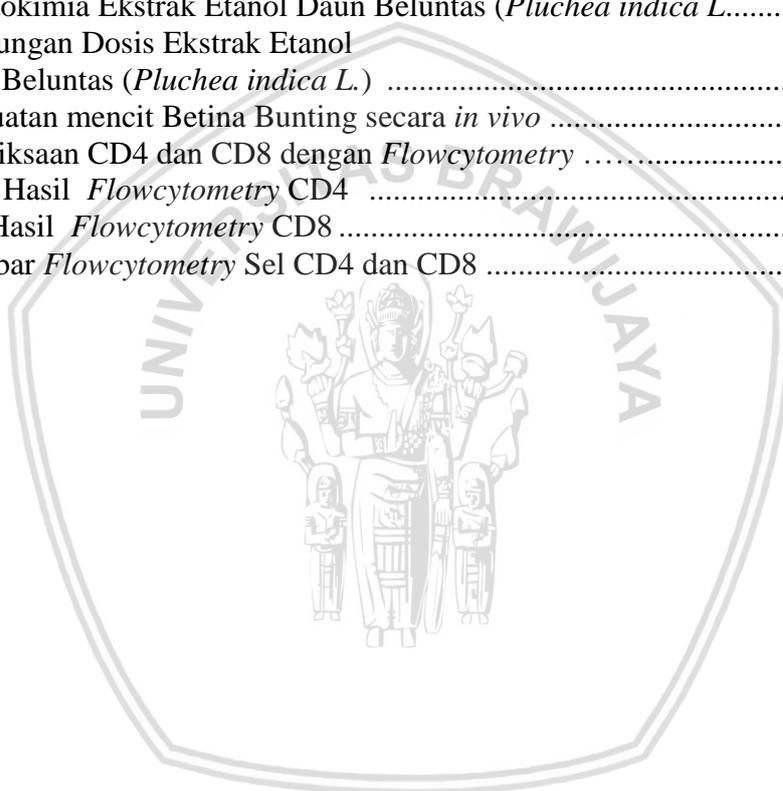
DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
2.1 Daun Beluntas (<i>Pluchea indica L</i>)	8
3.1 Kerangka Konseptual	20
5.2 Rata-Rata produksi CD4	34
5.2 Rata-Rata Persentase CD8.....	39



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Kerangka Operasional Penelitian	54
2. Sertifikat Laik Etik	55
3. Perhitungan Dosis PMSG dan HCG	56
4. Perhitungan Konsentrasi Bakteri <i>Staphylococcus aureus</i> 10 ²	58
5. Determinasi Tanaman Beluntas (<i>Pluchea indica</i> L.)	59
6. Uji Fitokimia Ekstrak Etanol Daun Beluntas (<i>Pluchea indica</i> L.).....	60
7. Perhitungan Dosis Ekstrak Etanol Daun Beluntas (<i>Pluchea indica</i> L.)	61
8. Pembuatan mencit Betina Bunting secara <i>in vivo</i>	65
9. Pemeriksaan CD4 dan CD8 dengan <i>Flowcytometry</i>	66
10. Data Hasil <i>Flowcytometry</i> CD4	68
9. Data Hasil <i>Flowcytometry</i> CD8	71
10. Gambar <i>Flowcytometry</i> Sel CD4 dan CD8	74



DAFTAR SINGKATAN DAN LAMBANG

Simbol/Singkatan	Keterangan
μL	MikroLiter
ANOVA	<i>Analysis of Variance</i>
<i>Bap</i>	<i>Biofilm associated protein</i>
BB	Berat Badan
BNF	<i>Buffer Netral Formaldehid</i>
BNJ	Beda Nyata Jujur
DMSO	<i>Dimethyl sulfoxide</i>
EPS	<i>Extracellular Polymeric Substance</i>
ETA	<i>Epidermolytic Toxin A</i>
ETB	<i>Epidermolytic Toxin B</i>
FnBPA	<i>Fibronectin-binding proteins</i>
HCG	<i>Pregnant Mare Serum Gonadotropin</i>
HE	<i>Hematoksin eosin</i>
Ig A	Imunoglobulin A
Kg	Kilogram
mg	Miligram
mg	Mililiter
MMP	<i>Modulation of Matrix Metalloproteinase</i>
MTP	<i>Microtiter plate</i>
NB	<i>Nutrient Brooth</i>
NF-kb	<i>Necrosis Factor-kb</i>
nm	nanometer
O ₂ -	Radikal superoksida
OD	<i>Optical density</i>
OH	<i>Hydroxyl radical</i>
PBS	<i>Posphate Buffer Saline</i>
PIA	<i>Polysacharide Intercellular Adhesion</i>
PMN	Polimorfonuklear
PMSG	<i>Pregnant Mare Serum Gonadotropin</i>
RAL	Rancangan Acak Lengkap
RES	<i>Reticulo Endothelial System</i>
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i>
rpm	Rotasi per menit
RS	Rumah Sakit
SC	<i>Subcutan</i>
SEM	<i>Scanning electron microscopy</i>
SPPS	<i>Statistical Package for the Social Sciences</i>
TNF-α	<i>Tumor Necrosis Factor</i>



BAB 1 PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Mastitis atau penyakit radang *mammae* merupakan masalah utama dalam peternakan sapi perah karena menyebabkan kerugian yang cukup besar sehubungan dengan penurunan produksi, kualitas, biaya, pengobatan dan perawatan yang cukup tinggi serta pengafkiran ternak lebih awal. Insiden mastitis pada sapi perah di Indonesia sangat tinggi (85%) baik mastitis klinis maupun subklinis. Bakteri penyebab mastitis yang paling sering adalah *S. aureus* dan beberapa jenis bakteri lain (Abeer *et al*, 2008)

Bakteri yang masuk ke dalam puting susu akan mengakibatkan perubahan air susu yang ada di dalam sinus sehingga air susu di dalamnya menjadi rusak. Selanjutnya rusaknya air susu akan merangsang timbulnya reaksi jaringan dalam bentuk peningkatan sel somatic di dalam air susu. Jonjot fibrin yang terbentuk membuat saluran jadi tersumbat dan kelenjar akhirnya mengalami kerusakan jaringan (Subronto, 2003).

Bakteri *S. aureus* masuk ke dalam puting. Setelah bakteri tersebut berhasil masuk ke dalam kelenjar, akan membentuk koloni yang dalam waktu singkat akan menyebar ke lobuli dan alveoli. Pada saat mikroorganisme sampai di mukosa kelenjar tubuh akan bereaksi dengan memobilisasi leukosit. *S. aureus* mempunyai arti penting sebagai penyebab mastitis subklinis karena bakteri ini dapat menyebar kemana-mana dan dapat membentuk koloni dengan baik pada kulit dan puting ambing. Proses radang ditandai dengan peningkatan suhu, jumlah darah yang mengalir, adanya perasaan sakit atau nyeri, bengkak dan gangguan fungsi. Adanya peradangan tersebut menyebabkan produksi air susu akan menurun (Brouillette, *et al.*, 2004)

Biofilm merupakan bentuk kumpulan mikroorganisme terutama bakteri yang diselimuti oleh pelekat karbohidrat yang dihasilkan oleh bakteri itu sendiri. Komposisinya meliputi sel-sel

mikroorganisme, produk ekstraseluler, polisakarida sebagai bahan pelekat dan air yang merupakan bahan penyusun utama biofilm. Polisakarida yang dihasilkan oleh bakteri untuk membentuk biofilm termasuk kedalam *Extracellular Polymeric Substance* (EPS). Bahan-bahan lain yang menyusun biofilm yaitu protein, lipid dan lektin (Sutherland, 2001). Kejadian infeksi diperkirakan 80% berkaitan dengan biofilm, sehingga biofilm dianggap sebagai mediator utama infeksi pada kejadian mastitis yang saat ini memiliki angka prevalensi yang sangat tinggi sekitar 60% di Indonesia (Sudarwanto *et al.*, 2006; Archer *et al.*, 2011).

Pemanfaatan tanaman obat yang mempunyai kandungan antibiofilm dapat digunakan sebagai salah satu alternatif karena dinilai aman, efektif dan murah (Hidayat dan Hardiansyah, 2012). Daun beluntas (*Pluchea indica* L.) yang diekstraksi menggunakan etanol mengandung zat aktif tanin dan flavonoid. Tanin dan flavonoid memiliki potensi sebagai antibiofilm karena menghambat *intercellular adhesion genes icaA* dan *icaD* (Lee *et al.*, 2013). *Gen icaA* dan *icaD* dapat mensintesis *Polysacharide Intercellular Adhesion* (PIA) yang berperan dalam pembentukan biofilm (Rohde *et al.*, 2010). Zat aktif tanin dan flavonoid yang terkandung dalam ekstrak etanol daun beluntas dimungkinkan menghambat pembentukan biofilm *S. aureus*. Dugaan ini berdasar penelitian Sunanto tentang efek ekstrak daun dewandaru (*Eugenia uniflora*) yang terbukti menghambat pembentukan biofilm *S. aureus*, karena ekstrak tersebut mempunyai kandungan zat aktif yaitu tanin dan flavonoid. Berdasarkan latar belakang tersebut diperlukan penelitian untuk melihat efek pemberian ekstrak etanol daun beluntas (*Pluchea indica* L.) terhadap gambaran histopatologi dan pembentukan biofilm kelenjar *mammae* pada hewan model mencit (*Mus musculus*) yang diinjeksi *S. aureus*.

Respon imun yang terjadi sebagai akibat adanya invasi dari bakteri *S. aureus* yaitu *S. aureus* sebagai antigen ketika masuk ke dalam tubuh akan dieliminasi oleh neutrofil dan

makrofag sebagai perannya pada sistem imun innate. Selain itu makrofag juga dapat berperan sebagai *antigen presenting cells* (APC). Di dalam makrofag, bakteri akan difagositosis dan juga akan dikenali oleh MHC II, kemudian akan dipresentasikan dalam bentuk antigen peptida. Selanjutnya, MHC II akan berikatan dengan limfosit T helper (CD4) pada bagian T Cell Receptor (TCR) (7). Sel T CD4+ yang teraktivasi akan kehilangan CD62L dan mengekspresikan berbagai molekul permukaan seperti CD25, CD44, CD69 yang bertujuan untuk melawan dan meregulasi aktivitas sel efektor yang teraktivasi akibat adanya paparan antigen bakteri. Kemudian sel T CD4+ efektor akan mensekresikan IFN- γ + yang berfungsi sebagai aktivasi makrofag, fagositosis, dan killing bakteri. Sel T CD4+ akan menghasilkan sitokin IL-2 yang megakibatkan aktivasi sel T sitotoksik (CD8+) dan sel T reg (CD4+CD25+). (Kobayashi, Kataoka and Yamamoto *et al.*, 2011).

1.2 Rumusan Masalah

1. Apakah pemberian ekstrak etanol daun beluntas dapat digunakan sebagai terapi mastitis pada mencit hasil induksi *S. aureus* berdasarkan ekspresi CD-4?
2. Apakah pemberian ekstrak etanol daun beluntas dapat digunakan sebagai terapi mastitis pada mencit hasil induksi *S. aureus* berdasarkan ekspresi CD-8?

1.3 Batasan Masalah

Berdasarkan latar belakang yang telah diuraikan, maka penelitian ini dibatasi pada:

1. Hewan model yang digunakan adalah mencit betina umur 2 bulan yang telah laktasi pada hari ke 12-14 (Brouillette *et al.*, 2004). Hewan model diperoleh dari Laboratorium Pemeliharaan Hewan *Institute Tropical Disease* Surabaya. Penggunaan hewan model dalam

penelitian telah mendapatkan sertifikat laik etik dari Komisi Etik Penelitian Universitas Brawijaya dengan No: 411-KEP-UB.

2. Pembuatan hewan model mastitis dengan cara penyuntikkan *intramammæ* pada mencit menggunakan spuit 1 cc dengan *needle blunt* ukuran 31 gauge (Brouillette, *et al.*, 2004).
3. Daun beluntas diekstraksi dengan menggunakan etanol 96% dengan metode maserasi (Permadani *et al.*, 2014).
4. Dosis terapi ekstrak etanol daun beluntas yang diberikan pada mencit model mastitis yaitu 2,625 mg/25 gram, 26,25 mg/ 25 gram dan 52,5 mg/25 gram dengan konsentrasi sebesar 60% secara *intramammæ* (Permadani *et al.*, 2014).
5. Variabel yang diamati dalam penelitian ini adalah hasil terapi ekstrak daun beluntas terhadap respon imun berdasarkan ekspresi CD-4 dan CD-8 menggunakan uji *flowcytometry*.

1.4 Tujuan

Berdasarkan latar belakang yang telah diuraikan, maka tujuan dari penelitian ini adalah:

1. Untuk mengetahui jumlah ekspresi sel T CD-4 pada hewan model mencit mastitis hasil induksi *S. aureus* pembentuk biofilm yang diterapi dengan ekstrak etanol daun beluntas.
2. Untuk mengetahui jumlah ekspresi sel T CD-8 pada hewan model mencit mastitis hasil induksi *S.aureus* pembentuk biofilm yang diterapi dengan ekstrak etanol daun beluntas.

1.5 Manfaat

1. Sebagai informasi dibidang medis, utamanya medis veteriner mengenai ekstrak etanol daun beluntas dapat digunakan sebagai kandidat terapi mastitis.
2. Sebagai bahan informasi dan sumber data untuk penelitian selanjutnya.

BAB II TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Mastitis

Mastitis secara umum didefinisikan sebagai peradangan jaringan internal kelenjar *mammae* yang dapat menurunkan produksi susu dalam jumlah besar, juga berpengaruh terhadap kualitas susu. Menurut gejala yang muncul pada sapi dikenal dua jenis mastitis yaitu mastitis klinis dan subklinis. Mastitis klinis adalah peradangan jaringan internal *mammae* yang ditandai dengan gejala klinis yang jelas dan terjadi perubahan pada bentuk *mammae*, perubahan susu dan keadaan hewan. Patogenesis mastitis terdiri dari tiga fase yaitu:

1. Fase invasi yaitu proses masuknya mikroorganisme ke dalam puting, biasa terjadi setelah pemerahan karena saluran kelenjar *mammae* terbuka dan didukung oleh keadaan lingkungan yang buruk.
2. Fase infeksi yaitu fase pembentukan mikroorganisme menjadi koloni dalam waktu singkat dan akan menyebar ke alveoli dari kelenjar *mammae*.
3. Fase infiltrasi adalah penyebaran mikroorganisme sampai kelenjar *mammae* sehingga menimbulkan radang yang menyebabkan sel-sel darah terlepas ke dalam susu, sehingga sifat susu dan susunannya berubah (Sudarwanto, 2000).

Penyebab mastitis yang infeksius pada sapi umumnya adalah bakteri *S. aureus*. Mastitis yang disebabkan oleh bakteri *S. aureus* dapat terjadi secara klinis bersifat perakut, akut, kronis dan subklinis.

Bentuk yang sering muncul adalah kronis dan subklinis karena dipengaruhi oleh stadium laktasi. Penyakit yang berat terjadi pada awal laktasi, menimbulkan gangrenous mastitis akut dengan serangan tiba-tiba, ditandai dengan anoreksia, demam tinggi, depresi, bengkak, dan sakit pada palpasi, hitam pada daerah gangren (24 jam), toksemia dan kematian bila tidak diobati.

Pada proses akut dengan gejala radang sistemik yang bisa terlihat, sekresi *purulent* dan bila berlanjut akan membentuk fibrosis. Pada kasus kronis atau subklinis, bakteri tahan terhadap fagositosis, bakteri terlindungi karena menyebabkan jaringan parut yang membentuk kantung-kantung infeksi dalam *mammae* sehingga sulit dijangkau oleh antibiotika. Hasil akhir terjadi penurunan produksi susu dan meningkatnya jumlah sel somatik (Tyasningsih *et al.*, 2010).

Mastitis merupakan salah satu infeksi pada mammary gland sapi perah yang sangat merugikan peternak, hal tersebut dapat menyebabkan penurunan pendapatan peternak dengan menurunnya produksi susu, kualitas susu segar, dan pengafkiran ternak lebih awal. Mastitis disebabkan oleh bakteri, kerusakan fisik ambing serta akibat bahan kimia yang dapat merusak jaringan interna ambing. Infeksi mastitis pada ternak perah sebagian besar disebabkan oleh tiga jenis bakteri penyebab mastitis yaitu *S. aureus*, *Streptococcus agalactiae* dan *Mycoplasma bovis* (Jayarao and Wolfgang, 2004).

2.1.1 Mastitis Subklinis

Mastitis Subklinis merupakan peradangan pada jaringan ambing tanpa dikesampingkan gejala klinis pada ambing, tetapi melalui pemeriksaan laboratorium akan didapatkan peningkatan jumlah sel radang, adanya mikroorganisme patogen dan terjadi perubahan kimia susu. Mastitis subklinis merupakan salah satu kasus mastitis dengan tingkat kejadian 15 - 40 kali lebih banyak dibandingkan dengan kasus mastitis klinis dan mencapai 97% dari keseluruhan kejadian mastitis (Ahmad, 2011).

2.2 Tanaman Beluntas (*Pluchea indica L*)

2.2.1 Klasifikasi

Klasifikasi ilmiah tumbuhan beluntas menurut Syamsuhidayat dan Hutapea (1991), adalah sebagai berikut :

Kingdom	: Plantae
Filum	: Spermathophyta
Sub divisi	: Angiospermae
Kelas	: Dicotyledonae
Ordo	: Asterales
Famili	: Asteraceae
Genus	: Pluchea
Spesies	: <i>Pluchea indica Less</i>

2.2.2 Morfologi dan Karakteristik

Beluntas merupakan tumbuhan semak yang bercabang banyak, berusuk halus dan berbulu lembut. Umumnya ditanam sebagai tanaman pagar atau bahkan tumbuhan liar, tingginya bisa mencapai dua hingga tiga meter apabila tidak dipangkas. Beluntas dapat tumbuh di daerah kering pada tanah yang keras dan berbatu, didaerah dataran rendah hingga dataran tinggi pada ketinggian 1000 meter di atas permukaan laut, memerlukan cukup cahaya matahari atau sedikit naungan dan perbanyaknya dapat dilakukan dengan stek pada batang yang sudah cukup tua. Beluntas termasuk tumbuhan berakut tunggang, akarnya bercabang dan berwarna putih kotor. Batangnya berambut halus, barkayu, bulat, bercabang, pada tumbuhan yang masih muda berwarna ungu setelah tua berwarna putih kotor (Dalimartha, 1999).

Daun beluntas bertangkai pendek letaknya berseling, tunggal dan berbentuk bulat telur dengan ukuran 2,5 - 8 cm x 1 - 5 cm, pangkal daun menirus, ujung daun meruncing, tepi daun berbau harum ketika dihancurkan (**Gambar 2.1**). Bunganya terdiri dari banyak tongkol pada terminal hemisferikal atau gundungan aksiler. Bunganya berbentuk tabung dengan panjang

mahkota 3,5 – 5 mm. Buahnya berbentuk silinder dengan panjang 1 mm dengan biji yang kecil berwarna coklat keputih – putihan (Dalimartha, 1999).

Beluntas merupakan tumbuhan perdu dengan tinggi dapat mencapai 2 m atau lebih, tumbuh di daerah kering di tanah yang keras berbatu, pantai dekat laut. Batangnya berkayu, bulat, tegak, bercabang. Memiliki daun tunggal, berbentuk bulat telur, tepi rata, ujung runcing, pangkal tumpul, berbulu halus, panjang 3,8 sampai 6,4 cm, lebar 2 sampai 4 cm, memiliki pertulangan menyirip dengan warna hijaumuda hingga hijau, berbau harum dan berasa agak getir (Ardiansyah, 2002).



Gambar 2.1 Daun Beluntas (*Pluchea indica* L)
(Sumber: Ferdian, 2010)

Di berbagai daerah di Indonesia beluntas dikenal dengan nama beluntas (Sumatra), baruntas (Sunda), luntas (Jawa Tengah), baluntas (Madura), lamutasa (Makassar). Sedangkan di luar Indonesia beluntas dikenal dengan nama lenabou (Timor), beluntas (Malaysia), beluntas (Singapura), dan khlu (Thailand) (Heyne, 1987).

2.2.3 Kandungan dan Manfaat

Penggunaan tumbuhan sebagai obat sangat berkaitan dengan kandungan kimia yang terdapat dalam tumbuh- tumbuhan tersebut terutama zat bioaktifnya. Senyawa bioaktif yang terdapat dalam tumbuhan biasanya merupakan senyawa metabolit sekunder. Metabolit primer biasanya mengandung asam amino, gugusan gula sederhana, asam nukleat dan lemak yang

berguna untuk proses- proses dalam sel misalnya pertumbuhan, fotosintesis, reproduksi dan metabolisme serta fungsi- fungsi primer lainnya, sedangkan metabolit sekunder dalam bentuk senyawa- senyawa aktif, berguna untuk mempertahankan diri. Tumbuhan dapat memproduksi sendiri berbagai jenis metabolit sekunder terbagi atas tiga bagian besar yaitu: terpen dan terpenoid yang terdiri ± 25.000 tipe, alkaloid yang terdiri dari ± 12.000 tipe, senyawa phenolic yang terdiri dari ± 8000 tipe (Zwenger *and* Basu, 2008; Schultz, 2011; Hassanpour *et al.*, 2011).

Daun beluntas berbau khas aromatik dan rasanya getir, banyak mengandung zat berkhasiat yang sering digunakan untuk menghilangkan bau badan, bau mulut, mengatasi kurang nafsu makan, mengatasi gangguan pencernaan pada anak, mengobati TBC kelenjar, menghilangkan nyeri pada rematik, nyeri tulang dan sakit pinggang, menurunkan demam, mengobati keputihan dan mengatasi haid yang tidak teratur (Dalimartha, 1999). Kandungan kimia dalam daun beluntas adalah: alkaloid, flavonoid, tanin, minyak atsiri, asam chlorogenik, natrium, kalium, aluminium, kalsium, magnesium, dan fosfor. Sedangkan akar beluntas mengandung tanin dan flavonoid (Dalimartha, 2005).

Sifat senyawa aktif tanin adalah senyawa phenolic dengan berat molekul yang cukup besar, berkisar antara 500- 3000 Da, bersifat larut dalam air, banyak didapatkan pada daun, kulit, buah, kayu dan akar tanaman dan umumnya didapatkan pada vakuola - vakuola dalam jaringan. Tanin berhubungan erat dengan mekanisme pertahanan tumbuhan terhadap mamalia herbivora, burung dan serangga sampai dengan saat ini definisi tentang tanin masih sukar dirumuskan secara tepat (Hassanpour *et al.*, 2011).

a. Tanin

Tanin digolongkan berdasarkan kemampuannya untuk membentuk suatu kompleks dengan protein, tanin merupakan zat aktif yang mempunyai aktivitas antimikroba, antikanker,

antioksidan, antiradikal dan berpotensi sebagai anti mutagenic (Karamać *et al.*, 2007) merupakan senyawa fenolik larut air, dapat menimbulkan reaksi umum dari senyawa fenol serta memiliki sifat- sifat khusus seperti presipitasi alkaloid, gelatin, dan protein - protein lain. Sedangkan berdasarkan struktur kimianya tanin dibagi menjadi dua kelompok besar yaitu: *hydrosable tanins* (HTs) dan *condensed tanins* (CTs) yang dibedakan oleh berat molekul dan struktur serta efeknya yang berbeda terhadap herbivora khususnya hewan memamah biak. HTs biasanya ditemukan dalam konsentrasi yang rendah pada tumbuhan dibandingkan dengan CTs. HTs dapat membentuk senyawa *pyrogallol* yang bersifat toksik terhadap mamalia (Patra and Saxena, 2010; Hassanpour *et al.*, 2011).

b. Flavonoid

Senyawa Flavonoid adalah suatu kelompok fenol yang terbanyak di alam. Senyawa-senyawa ini bertanggungjawab terhadap zat warna merah, ungu, biru dan kuning pada mahkota bunga dengan tujuan untuk menarik serangga yang membantu penyerbukan (Agoes, 2010). Flavonoid khususnya flavonoid seperti katekin merupakan senyawa polyphenolic yang umum didapatkan pada tumbuhan yang banyak dikonsumsi oleh manusia. Flavonoid terdapat dalam jumlah kecil merupakan bioflavonoid yang asli contohnya adalah quercetin. Flavonoid tersebar luas pada berbagai macam tanaman, toksisitasnya rendah dibandingkan dengan senyawa aktif yang lain, membuatnya banyak dikonsumsi oleh hewan dan manusia.

Berdasarkan ikatannya dengan gula, flavonoid terdiri dari dua kelompok yaitu glikosida yang berikatan dengan satu atau lebih molekul gula, dan yang lain yaitu aglikogen adalah flavonoid yang tidak berikatan dengan gula. Kebanyakan flavonoid yang berasal dari tumbuh - tumbuhan adalah dalam bentuk glikosida (Williamson, 2004). Aktivitas farmakologis dari flavonoid dianggap berasal dari rutin (glikosida flavonol). Flavonoid dapat digunakan sebagai

obat karena mempunyai bermacam- macam bioaktifitas seperti: antiinflamasi, antibakteri, anti kanker, antifertilitas, antiviral, antidiabetes, antidepresan dan antidiare (Spencer *and* Jeremy, 2008; Cushnie *and* Lamb, 2011).

2.3 *Staphylococcus aureus*

2.3.1 Klasifikasi

Berikut ini klasifikasi *S. aureus* menurut Todar (2008):

Domain	: Bacteria
Kingdom	: Eubacteria
Filum	: Firmicutes
Kelas	: Cocci
Ordo	: Bacillales
Family	: Staphylococcaceae
Genus	: Staphylococcus
Spesies	: <i>Staphylococcus aureus</i>

2.3.2 Morfologi dan Karakteristik

Staphylococcus aureus merupakan bakteri gram positif berbentuk bulat berdiameter 0,7-1,2 μm , tersusun dalam kelompok-kelompok yang tidak teratur seperti buah anggur, fakultatif anaerob, tidak membentuk spora, dan tidak bergerak. Bakteri ini tumbuh pada suhu optimum 37 °C, tetapi membentuk pigmen paling baik pada suhu kamar (20-25 °C). Koloni pada perbenihan padat berwarna abu-abu sampai kuning keemasan, berbentuk bundar, halus, menonjol, dan berkilau. Lebih dari 90% isolat klinik menghasilkan *S. aureus* yang mempunyai kapsul polisakarida atau selaput tipis yang berperan dalam virulensi bakteri (Jawetz *et al.*, 1995).

2.3.3 Identifikasi *Staphylococcus aureus*

Identifikasi *S. aureus* dapat diawali dengan pewarnaan gram. Pewarnaan gram digunakan untuk mengidentifikasi bakteri berdasarkan komponen penyusun dinding selnya. *S. aureus* merupakan bakteri gram positif yang berarti mempunyai lapisan peptidoglikan yang tebal (90% dari dinding sel) dan berwarna ungu ketika diberi pewarnaan gram (Smith and Hussey, 2005). Uji katalase digunakan untuk membedakan *Streptococcus* (katalase negatif) dengan *Staphylococcus* yang menghasilkan enzim katalase (katalase positif). Uji katalase dilakukan dengan meneteskan hidrogen peroksida 3% pada biakan bakteri (Todar, 2008). Uji koagulase dapat digunakan untuk membedakan spesies *Staphylococcus* berdasarkan kemampuan koagulasi plasma darah (Roberson *et al.*, 1994). *S. aureus* menunjukkan hasil uji koagulasi positif (Todar, 2008). Selain itu identifikasi *S. aureus* dapat dilakukan dengan kultur di media *Mannitol Salt Agar* (MSA). *S. aureus* dapat memfermentasi manitol pada media MSA sehingga terbentuk koloni berwarna kekuningan (Quinn *et al.*, 2002).

2.3.4 Patogenesa

Bakteri *S. aureus* berasal dari kulit di sekitar ambing, tangan pemerah, kain yang digunakan untuk mengeringkan ambing, mesin pemerah dan lingkungan sekitar kandang. Infeksi terjadi saat kondisi otot dari puting susu terbuka dan *S. aureus* masuk melalui teat canal. Sebanyak 102 cfu (*colony forming unit*) *S. aureus* mampu menimbulkan mastitis dan koagulase negatif paling banyak dilaporkan sebagai penyebab mastitis subklinis pada kambing (Moroni *et al.*, 2005). Tahap selanjutnya bakteri menempel pada permukaan sel epitel kelenjar *mammae*, membentuk koloni dan berkembang lebih lanjut. Gambaran mikroskopis kelenjar *mammae* yang

terinfeksi *S. aureus* terlihat ada ulserasi, erosi dari sel - sel duktus laktiferus, infiltrasi sel radang dalam sel alveoli dan terjadi penyusutan sel alveoli.

Infeksi *S. aureus* dipengaruhi oleh tipe permukaan dinding sel bakteri yang mempunyai sifat hidrofobisitas yang tinggi, sehingga memudahkan reaksi penempelan antara *S. aureus* dengan sel epitel kelenjar *mammae*. Penelitian yang dilakukan oleh (Zecconi *et al.*, 2006) menunjukkan adanya protein ekstraseluler seperti kolagen dan fibronektin (Fn) yang akan memudahkan terjadinya reaksi penempelan antara *S. aureus* dengan sel epitel kelenjar *mammae*. Reaksi penempelan *S. aureus* dengan sel epitel kelenjar *mammae* ada dua tipe yaitu reaksi spesifik dan non spesifik yang merupakan reaksi fisika kimia.

2.4 Biofilm

Biofilm merupakan bentuk struktural dari sekumpulan mikroorganisme yang dikelilingi oleh matrik pelindung yang disebut *Extracellular Polymeric Substance* (EPS) yang berfungsi untuk melindungi mikroorganisme tersebut dari pengaruh buruk lingkungan seperti sinar ultra violet, toksisitas logam, paparan asam, dehidrasi, kadar garam yang tinggi, fagositosis serta perlindungan dari antibiotik. Biofilm dapat terbentuk pada permukaan pada maupun cair (Stoodley *et al.*, 2004).

Pembentukan biofilm oleh mikroorganisme diawali dengan proses penempelan mikroorganisme ke suatu permukaan, pembentukan ini juga dipengaruhi oleh zat ekstraseluler yang diproduksi oleh mikroorganisme. Pembentukan biofilm merupakan masalah utama dalam pengendalian mikroorganisme patogen karena adanya biofilm dapat meningkatkan virulensi dan patogenesis mikroorganisme, sehingga diperlukan pengembangan strategi pengendalian biofilm agar permasalahan biofilm dapat diatasi (Cortes *et al.*, 2011).

2.5 Imunitas Terhadap Mastitis

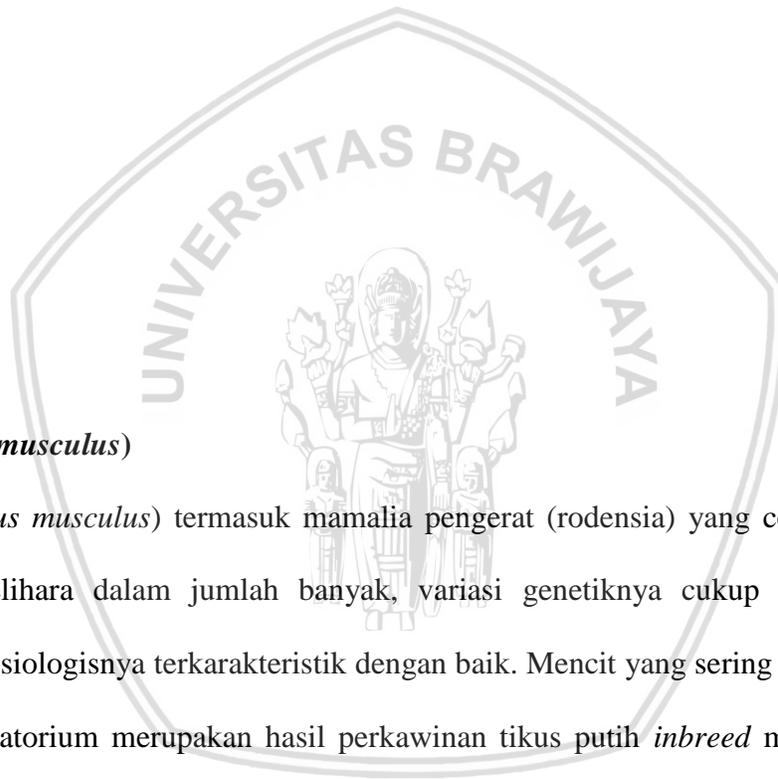
2.5.1 Sel CD4

Mastitis merupakan radang ambing yang disebabkan oleh bakteri *S. aureus*. Sistem pertahanan tubuh atau respons imun yang terjadi sebagai akibat adanya invasi bakteri *S. aureus*. *S. aureus* sebagai antigen ketika masuk ke dalam tubuh akan dieliminasi oleh sistem imun innate yaitu neutrofil, sel NK dan makrofag. Selain itu makrofag juga dapat berperan sebagai *antigen presenting cells* (APC) sebagai pemicu respon imun adaptif. Di dalam makrofag, bakteri akan difagositosis kemudian dikenali oleh *major histocompatibility complex II* (MHC II) sebagai marker dan komplemen dari sel T CD4, kemudian akan dipresentasikan dalam bentuk antigen peptida. Selanjutnya, MHC II akan berikatan dengan limfosit T CD4. Limfosit T CD4 diketahui mempunyai beberapa molekul permukaan yang spesifik terhadap bakteri intraselular. Antigen peptide yang telah dipresentasikan oleh MHC II akan berikatan dengan limfosit T helper (CD4) pada bagian *T Cell Receptor* (TCR) (Abbas and Lichman, 2005). Sel T CD4+ yang teraktivasi akan kehilangan CD62L dan mengekspresikan berbagai molekul permukaan seperti CD25, CD44, CD69 yang bertujuan untuk melawan dan meregulasi 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+ akan menghasilkan sitokin interleukin 2 (IL-2) yang memicu aktivasi sel T sitotoksik (CD8+) dan sel T reg (CD4+CD25+) (Abbas and Lichman, 2005).

2.5.2 Sel CD8

Sel T CD8 yang keluar dari timus disebut juga CTL/Tc mengenal kompleks antigen MHC-1 yang dipresentasikan APC. Molekul MHC-1 ditemukan pada semua sel tubuh yang bernukleus. Fungsi utama sel CD8 adalah menyingkirkan sel terinfeksi virus, menghancurkan sel ganas dan sel histoin kompatibel yang menimbulkan penolakan pada

transplantasi. Dalam keadaan tertentu, CTL/Tc juga dapat menghancurkan sel yang terinfeksi bakteri intraselular. Sel Tc menimbulkan sitolisis melalui perforin granzin, apoptosis, TNF- α dan memacu sitokin Th1 dan Th2.



2.6 Mencit (*Mus musculus*)

Mencit (*Mus musculus*) termasuk mamalia pengerat (rodensia) yang cepat berkembang biak, mudah dipelihara dalam jumlah banyak, variasi genetiknya cukup besar serta sifat anatomisnya dan fisiologisnya terkarakteristik dengan baik. Mencit yang sering digunakan dalam penelitian di laboratorium merupakan hasil perkawinan tikus putih *inbreed* maupun *outbreed*. Dari hasil perkawinan sampai generasi 20 akan dihasilkan strain murni dari mencit.

Klasifikasi dari mencit (*mus musculus*) sebagai berikut (Smith and Mangkoewidjojo, 1988):

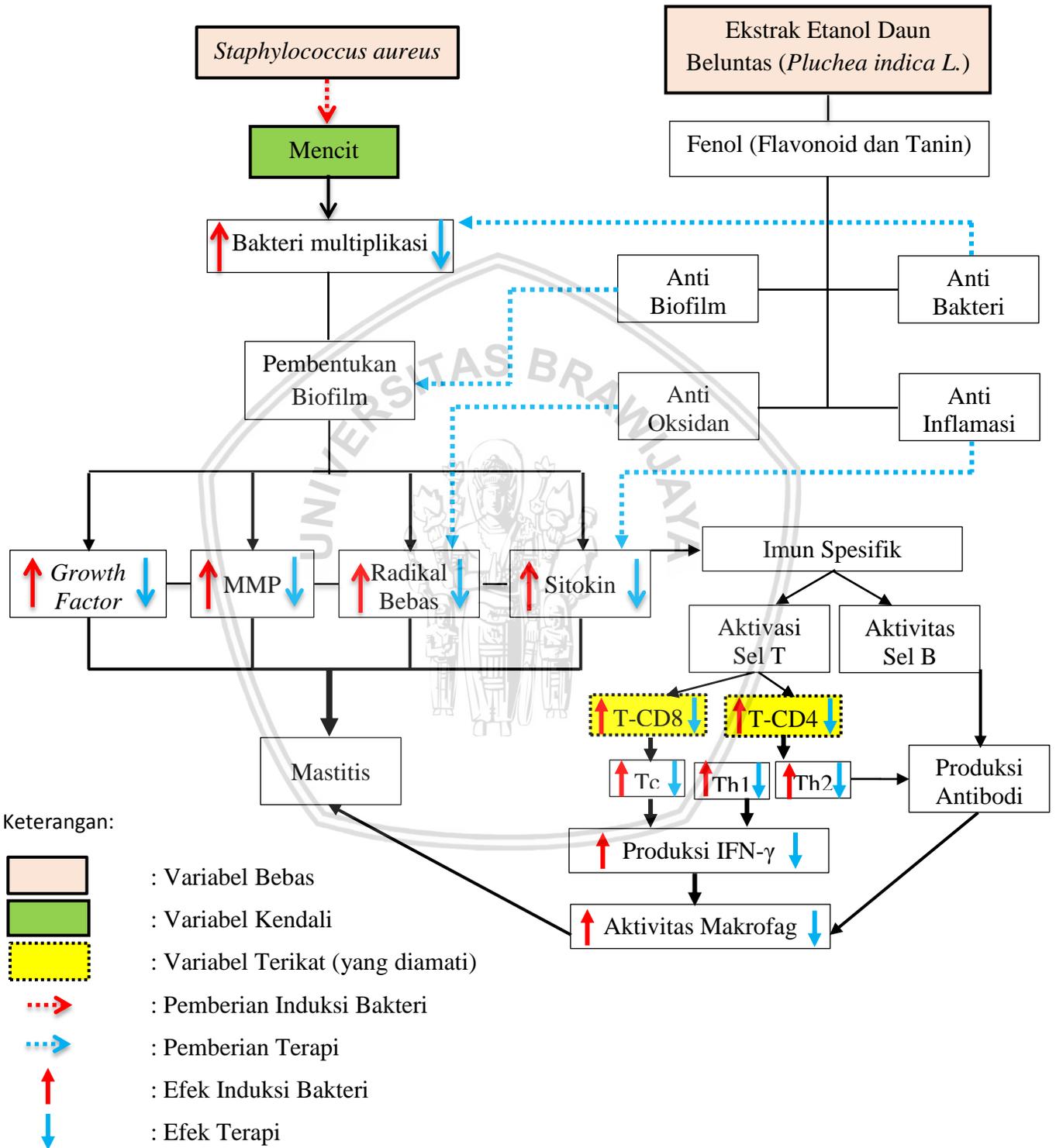
Kingdom : Animalia
Phylum : Chordata

Sub phylum : Vertebrata
Class : Mammalia
Ordo : Rodentia
Family : Muridae
Genus : Mus
Species : *Mus musculus*.

Mencit (*Mus musculus*) memiliki ciri-ciri berupa bentuk tubuh kecil, berwarna putih, memiliki siklus estrus teratur yaitu 4-5 hari. Kondisi ruang untuk pemeliharaan mencit (*Mus musculus*) harus senantiasa bersih, kering dan jauh dari kebisingan. Suhu ruang pemeliharaan juga harus dijaga kisarannya antara 18-19°C serta kelembaban udara antara 30-70%. Mencit betina dewasa dengan umur 35-60 hari memiliki berat badan 18-35 g. Lama hidupnya 1-2 tahun, dapat mencapai 3 tahun. Masa reproduksi mencit betina berlangsung 1,5 tahun. Mencit betina ataupun jantan dapat dikawinkan pada umur 8 minggu. Lama kebuntingan 19-20 hari. Jumlah anak mencit rata-rata 6-15 ekor dengan berat lahir antara 0,5-1,5 g. Mencit sering digunakan dalam penelitian dengan pertimbangan hewan tersebut memiliki beberapa keuntungan yaitu daur estrusnya teratur dan dapat dideteksi, periode kebuntingannya relatif singkat, dan mempunyai anak yang banyak serta terdapat keselarasan pertumbuhan dengan kondisi manusia (Akbar, 2010).

BAB III KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS

3.1 Kerangka Konsep



Gambar 3.1 Kerangka Konsep Penelitian

Staphylococcus aureus diinjeksikan pada mencit (*Mus musculus*) laktasi hari ke 12 untuk dibuat menjadi hewan model mastitis. *S. aureus* mengalami adhesi dan membentuk EPS sebagai matrik pelindung bakteri yang membentuk biofilm. Bakteri berkolonisasi pada sel epitel alveolar sehingga mempermudah bakteri menghasilkan produk metabolisme yang menyebabkan reaksi imun. Bakteri melakukan invasi dan bertahan hidup hingga berkembang biak dalam sel inang pada sitosol dan lisosom. Sel epitel alveolar sebagian besar mengalami degenerasi dan nekrosis sehingga tidak mampu menghasilkan sekresi akibatnya lumen alveoli mengalami penyempitan sehingga terjadi perubahan jumlah kelenjar. Mekanisme kerusakan sel oleh bakteri dapat dilakukan dengan merangsang proses inflamasi dengan cara sel-sel imunitas dalam jaringan. Peningkatan sel-sel imunitas seperti monosit, makrofag, neutrofil akan mengaktivasi keluarnya INF- γ sebagai sitokin proinflamatori, peningkatan radikal bebas, NF-kb serta *growth factor*. NF-kb dapat merangsang terjadinya inflamasi dengan menginduksi transkripsi sitokin-sitokin proinflamasi, reseptor sitokin dan enzim seperti MMP (*Matrix Methaloproteinase*). Sitokin proinflamasi yang diinduksi oleh NF-kb selanjutnya merangsang kembali aktivitas NF-kb sehingga inflamasi dapat dipertahankan dalam waktu yang lama, yang mengakibatkan *growth factor* tidak mampu bekerja secara maksimal di jaringan.

Respon imun dari masuknya *S. aureus* diawali dengan respon imun non spesifik. Respon ini ditandai dengan makrofag yang melepaskan sitokin yang memicu peradangan berupa perbesaran pembuluh darah sehingga terjadi peningkatan aliran darah dan merangsang makrofag semakin banyak terproduksi. Adanya kerja dari makrofag menyebabkan sel dendritik yaitu *antigen precenting cell* (APC) untuk merangsang sel T naif sebagai respon imun spesifik. Respon imun spesifik melibatkan sel limfosit T dan sel limfosit B. Sel limfosit B bekerja untuk memproduksi antibodi dan pengenalan bakteri sedangkan sel limfosit T sebagai pengantar sel

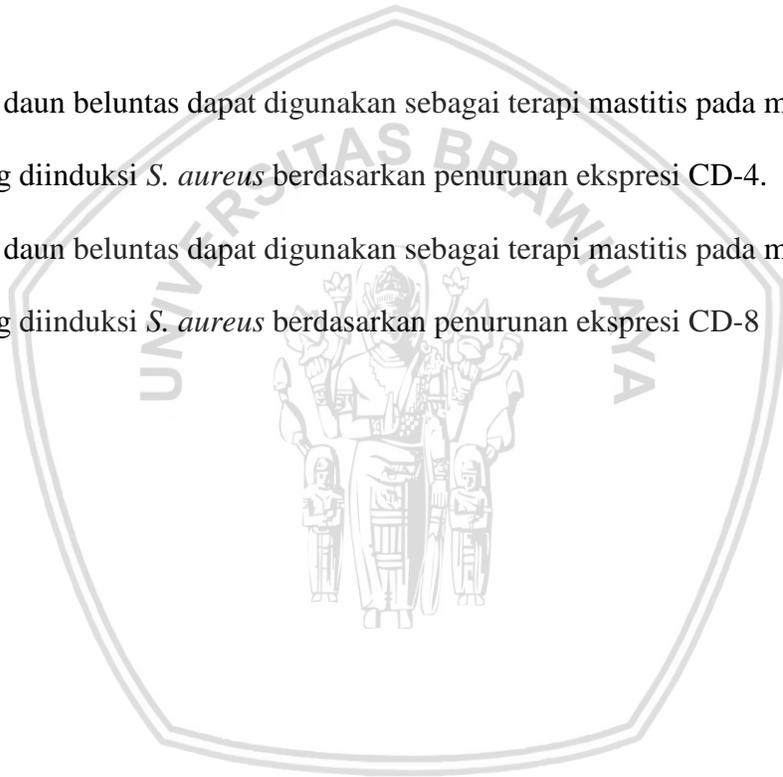
imun berupa CD4 dan CD8. Sel T CD4 yang dikenal sebagai sel T *helper* dibagi menjadi dua, yaitu Th1 yang bekerja untuk memacu respon imun humoral untuk meningkatkan produksi IFN- γ dengan tujuan untuk memperbanyak aktivitas makrofag dan Th2 akan menginduksi maturasi sel limfosit B untuk memproduksi antibodi. Tugas sel B dilaksanakan oleh imunoglobulin yang disekresi oleh sel plasma, hasil akhir dari aktivitas sel B adalah eliminasi antigen dan pembentukan sel memori yang membentuk resistensi tubuh terhadap paparan antigen yang sama, akan cepat berpoliferasi dan berdiferensia mempercepat kerja makrofag. Sedangkan sel T CD8 sebagai sel T *killer* atau sel T sitotoksik yang menghancurkan mikroorganisme yang masuk dalam tubuh. Sel T CD4 dan CD8 dapat menghancurkan dan membunuh mikroorganisme serta menginduksi antibodi dalam pengikatan antigen.

Adanya senyawa-senyawa aktif pada daun beluntas berupa flavonoid dan tanin mempunyai aktivitas sebagai antibakteri, antibiofilm, antiinflamasi dan antioksidan. Aktivitas sebagai antibakteri menghambat pertumbuhan maupun membunuh bakteri *S. aureus*. Kemampuan yang dimiliki flavonoid dalam memberikan efek antibakteri antara lain dengan menghambat fungsi membran sitoplasma, menghambat sintesa asam nukleat menghambat aktivitas bakteri dengan jalan mengganggu rantai transport elektron respirasi dan tahap selanjutnya dilanjutkan proses penyembuhan jaringan. Aktivitas sebagai antibiofilm bekerja dengan menghambat sintesis PIA yang berperan dalam regulasi pembentukan biofilm. PIA merupakan faktor penting dalam pembentukan biofilm *S. aureus* dan berperan penting dalam proses adhesi, agregasi sel dan pembentukan *Extracellular Polymeric Substance* (EPS) sehingga penghambatan sintesis PIA dapat menghambat pembentukan biofilm *S. aureus*. Kandungan dari ekstrak etanol yang berupa fenol, flavonoid dan tanin dapat menekan aktivitas bakteri, anti inflamasi, antibiofilm, antioksidan dan antiinflamasi. Dengan adanya terapi daun beluntas

diharapkan bisa menekan inflamasi ditandai dengan penurunan sitokin-sitokin proinflamasi yang merupakan system imun spesifik, penurunan aktivitas sel T dan sel B berupa CD4 dan CD8. Sitokin-sitokin proinflamasi menurunkan sel Tc, sel Th1 dan Th2 dan penurunan IFN- γ memacu penurunan aktivitas makrofag. Sehingga diharapkan dari pemberian ekstrak etanol daun beluntas dapat menurunkan peradangan dan inflamasi dengan ditandai adanya penurunan jumlah sel yang mengekspresikan CD4 dan CD8.

3.2 Hipotesis

1. Ekstrak etanol daun beluntas dapat digunakan sebagai terapi mastitis pada mencit (*mus musculus*) yang diinduksi *S. aureus* berdasarkan penurunan ekspresi CD-4.
2. Ekstrak etanol daun beluntas dapat digunakan sebagai terapi mastitis pada mencit (*mus musculus*) yang diinduksi *S. aureus* berdasarkan penurunan ekspresi CD-8



BAB IV METODOLOGI PENELITIAN

4.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian pembuatan ekstrak etanol daun beluntas (*Pluchea indica L.*) dilakukan di Materia Medica Batu sedangkan tahapan pembuatan hewan model mastitis, pemberian ekstrak daun beluntas dan pemeriksaan dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Program Kedokteran Hewan dan Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Penelitian dilakukan pada bulan Juli sampai Desember 2015.

4.2 Populasi dan Sampel

4.2.1 Populasi

Populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah mencit (*Mus musculus*) betina laktasi dalam kondisi yang sehat ditandai dengan gerakan yang aktif. Mencit ini diperoleh dari Laboratorium Pemeliharaan Hewan *Institute Tropical Disease* Surabaya.

4.2.2 Sampel

Sampel menggunakan mencit (*Mus musculus*) betina laktasi yang telah melahirkan 12 hari. Bobot badan mencit antara ± 25 gram. Hewan coba diadaptasikan selama tujuh hari untuk menyesuaikan dengan kondisi di laboratorium.

4.3 Perhitungan Sampel

Penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL), sehingga menggunakan rumus perhitungan estimasi jumlah pengulangan sebagai berikut (Kusriningrum, 2008)

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

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

$$5n-5 \geq 15$$

$$5n \geq 20$$

$$n \geq 4$$

Keterangan:

T : jumlah perlakuan dosis ekstrak etanol daun beluntas (*Pluchea indica L.*) yang diberikan 2,625 mg/25 gram, 26,25 mg/25 gram dan 52,5 mg/25 gram serta kontrol positif dan kontrol negatif).

n : jumlah ulangan yang diperlukan.

Berdasarkan perhitungan tersebut, maka untuk lima macam perlakuan diperlukan minimal empat pengulangan dalam setiap perlakuan. Pada penelitian ini pengulangan dilakukan sebanyak lima kali dalam setiap kelompok, sehingga dibutuhkan 25 ekor hewan coba.

4.4 Rancangan Penelitian

Penelitian ini bersifat eksperimental menggunakan rancangan acak lengkap (RAL).

Rancangan penelitian ditunjukkan **tabel 4.1**

Tabel 4.1 Rancangan Penelitian

Kelompok	Keterangan
Kontrol negatif	Mencit tidak diberikan perlakuan (tidak diinduksi S.

	<i>aureus</i> dan tidak diberi terapi ekstrak etanol daun beluntas)
Kontrol positif	Mencit yang diberi <i>S. aureus</i> sebanyak 10^2 CFU/ml dan tidak mendapat terapi.
Perlakuan 1	Mencit diinjeksi <i>S. aureus</i> sebanyak 10^2 CFU/ml dan mendapat terapi dengan dosis 2,625 mg/25 gram secara intra <i>mammae</i> selama 4 hari.
Perlakuan 2	Mencit diinjeksi <i>S. aureus</i> sebanyak 10^2 CFU/ml dan mendapat terapi dengan dosis 26,25 mg/25 gram secara intra <i>mammae</i> selama 4 hari.
Perlakuan 3	Mencit diinjeksi <i>S. aureus</i> sebanyak 10^2 CFU/ml dan mendapat terapi dengan dosis 52,5 mg/25 gram secara intra <i>mammae</i> selama 4 hari.

4.5 Variabel Penelitian

Adapun variabel yang diamati dalam penelitian ini adalah:

Variabel bebas : Ekstrak etanol daun beluntas, induksi *S. aureus*

Variabel tergantung : Sel yang mengekspresikan sel T CD-4 dan sel T CD-8

Variabel kendali : Berat badan mencit, umur mencit, dan jenis kelamin mencit, lingkungan, kandang, pakan, metode produksi *S. aureus*.

4.6 Materi Penelitian

Alat pemeliharaan hewan coba terdiri dari kandang dari kotak plastic dengan ukuran 35 x 27,5 x 12 cm untuk setiap perlakuan, tutup kandang dari anyaman kawat, meja tempat meletakkan kandang, tempat pakan dan minum, lampu dan sekam. Alat preparasi dan pemberian streptokinase pada hewan coba terdiri atas tabung appendof, mikro pipet, yellow tip, *sprit insulin* 1 mL, ice box dan kapas. Alat preparasi dan pemberian ekstrak etanol daun kemangi pada hewan coba terdiri atas timbangan analitik, plastik klip, aluminium foil, botol 50 mL, sonde lambung dan *sprit* 1 mL Terumo, sendok makan, lap steril untuk memudahkan *handle* hewan coba. Alat pembedahan mencit setelah perlakuan dan preparasi organ limpa untuk pengujian *flowcytometry* terdiri atas gunting, *pinset*, papan pembedahan hewan coba, *cawan petri pyrex*, *sprit* 1 mL

Terumo, spuit 5 mL Terumo, *sentrifuge tube*, mikropipet 1000 mikroliter *Corning*, mikropipet 10 mikroliter *Corning*, tabung *appendof*, rak *appendof*, sentrifus, masker, sarung tangan, dan tissue. Alat pada pengujian *flowcytometry* terdiri atas tabung propilen, *microtube*, kuvet, *BD FACS Calibur™ flowcytometer* dan *Software Cell Quest Pro™*.

4.6.1 Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini, yaitu Mencit betina (*Mus musculus*) dengan berat \pm 25 gram, bakteri *S. aureus*, hormone *Pregnant Mare Serum Gonadotropin* (PMSG), hormone *Human Chorionic Gonadotropin* (HCG), Ekstrak etanol daun beluntas. Bahan yang digunakan untuk pembedahan mencit setelah perlakuan dan bahan preparasi organ limpa untuk pengujian *flowcytometry* terdiri atas alkohol 70% dan PBS steril. Bahan pada uji *flowcytometry* terdiri atas PBS steril, antisel T CD-4 dan CD-8.

4.6.2 Alat Penelitian

Alat pemeliharaan hewan coba terdiri dari kandang dari kotak plastic dengan ukuran 35 x 27,5 x 12 cm untuk setiap perlakuan, tutup kandang dari anyaman kawat, meja tempat meletakkan kandang, tempat pakan dan minum, lampu dan sekam. Alat preparasi dan terdiri atas tabung *appendof*, mikro pipet, *yellow tip*, spuit insulin 1 mL, *ice box* dan kapas Timbangan, kandang mencit, alat bedah, papan bedah, objek *glass*, *needle* 30 G, *syringe* 1 cc dan 5 cc, mikroskop, *hematoxylen*, *cover glas*, *shaker* inkubator, lemari pendingin, 26 pot steril, *cotton swab steril*, tabung reaksi, *aluminium foil*, *microplate flat 96 well*, mikrotiter, *yellow tip*, *blue tip*, *microplate reader* (BIO-RAD Model 550). Alat pengujian *flowcytometry* dan software pembaca hasil *flowcytometry*.

4.7 Cara Kerja Penelitian

4.7.1 Persiapan Hewan Coba

Mencit yang akan digunakan untuk penelitian diaklimatisasi di dalam kandang terlebih dahulu terhadap lingkungannya selama tujuh hari. Mencit diberikan pakan berupa ransum basal berisikan serat (5%), protein (20%), dan lemak (5-10%), bisa berbentuk serbuk atau pelet yang diberikan secara teratur dan diberikan air minum *adlibitum*. Rata-rata konsumsi pakan mencit perhari (5 g/100 g BB/Hari) (Hamilton, 1998). Selanjutnya mencit dibagi menjadi 5 kelompok perlakuan. Setiap kelompok perlakuan terdiri dari 4 ekor mencit. Kandang mencit untuk penelitian ini dikandangkan pada kandang yang berukuran 17.5 x 23.75 x 17.5 cm yang terbuat dari *stainless steel* untuk tiap ekor mencit. Suhu optimum ruangan untuk mencit adalah 22-24°C dan kelembaban udara 50-60% dengan ventilasi yang cukup.

4.7.2 Pembuatan Mencit Betina Bunting

Pembuatan mencit betina bunting dilakukan secara *in vivo*. Sebelum dilakukan pengawinan monomating yaitu pengawinan satu mencit jantan dengan satu mencit betina dalam satu kandang, dilakukan terlebih dahulu penyuntikan *Pregnant Mare Serum Gonadotropin* (PMSG) dengan 5 IU. Setelah 48 jam kemudian disuntik *Human Chorionic Gonadotropin* (HCG) 5 IU dan dikawinkan. Setelah 17 jam pasca perkawinan dilihat adanya sumbat vagina (vaginal plug). Sumbat vagina merupakan bagian dari cairan vagina beserta plasma semen yang sudah menggumpal. Apabila terdapat sumbat vagina maka mencit dianggap bunting. Kemudian dilakukan randomiasi untuk menentukan sampel penelitian (Siburian and Marlinza, 2009).

4.7.3 Pembuatan Hewan Model Mastitis

Pembuatan hewan model mastitis menggunakan mencit laktasi hari ke 12, dengan berat \pm 25 gram. Kotoran dibersihkan 1-2 jam sebelum bakteri di inokulasikan pada kelenjar *mammae* melalui puting. Injeksi menggunakan *syringe* 1 cc dengan *needle blunt* ukuran 31 gauge untuk

menginokulasikan di L4 (*mammae* sebelah kiri yang keempat dari *cranial*) dan R4 (*mammae* sebelah kanan yang keempat dari *cranial*). Pemberian *S. aureus* pembentuk biofilm adalah dengan cara injeksi *intramammae*, hal ini bertujuan untuk membuat hewan model mastitis. Suspensi *S. aureus* diinjeksi sebanyak 0,1 ml dengan dosis infeksi 1.4×10^2 CFU (Brouillette, *et al.*, 2004). Perhitungan konsentrasi bakteri *S. aureus* dilakukan menggunakan *spektrofotometer* pada **lampiran 4** dengan panjang gelombang 625 nm untuk mengetahui absorbansi.

4.7.4 Pra Penelitian

Mencit yang digunakan adalah 3 ekor mencit laktasi hari ke 12 yang diinjeksikan bakteri *S. aureus* dengan konsentrasi sebesar 10^1 CFU/ml, 10^2 CFU/ml, 10^3 CFU/ml yang diinjeksikan melalui *intramamae* masing-masing sebanyak 1 cc. Pra penelitian bertujuan untuk mengetahui dosis infeksi bakteri yang dapat menyebabkan mastitis pada mencit.

4.7.5 Pembuatan Ekstrak Etanol Daun Beluntas

Serbuk daun beluntas 1 kg diekstraksi menggunakan etanol 96% dengan metode maserasi kemudian dilakukan evaporasi 40°C untuk menguapkan sisa pelarut, sehingga hasil dari evaporasi ini merupakan cairan kental (Permadani, *et al.* 2014).

4.7.6 Dosis Ekstrak Etanol Daun Beluntas

Penelitian sebelumnya menyatakan bahwa kandungan flavonoid dengan konsentrasi 60% (60 mg/ ml) mampu membunuh bakteri *S. aureus* (Khunaifi, 2010). Merujuk pada penelitian (Rahayu, 2012) bahwa ekstrak etanol daun beluntas digunakan sebagai antibakteri dan antipiretik dengan dosis 15 mg/200 gram tikus. Dosis tersebut dikonversikan menggunakan faktor konversi dari tikus ke mencit yaitu 0,14 sehingga pada penelitian ini digunakan tiga variasi dosis sebagai

terapi yaitu 2,625 mg/25 gram BB mencit, 26,25 mg/25 gram BB mencit dan 52,5 mg/25 gram BB mencit.

4.7.7 Pemberian Ekstrak Etanol Daun Beluntas pada Tikus Model Mastitis

Terapi ekstrak etanol daun beluntas diinjeksikan secara *intramammae* dengan dosis 2,625 mg/25 gram mencit, 26,25 mg/25 gram mencit dan 52,5 mg/25 gram mencit dengan konsentrasi 60%. Ekstrak etanol daun beluntas diberikan pada kelompok mencit P1, P2 dan P3 dengan Dosis pada **Lampiran 7** sehari satu kali selama empat hari.

4.7.7 Preparasi Organ Limpa

Pembedahan hewan model dimulai dengan melakukan *cervical dislocatio* kemudian dilakukan pencukuran rambut di sekitar *mammae* menggunakan silet dan didesinfeksi menggunakan alkohol 70%. Pembedahan dilakukan secara steril dengan menggunakan bunsen yang diletakkan di sekitar tempat pembedahan dan mengganti alat bedah untuk setiap hewan. Pengambilan sampel kelenjar *mammae* menggunakan gunting tajam tumpul dan segera dibawa ke laminar flow untuk dilakukan swab bakteri dan diinokulasikan pada media *Nutrient Broth* (NB) untuk pemeriksaan pembentukan biofilm. Kelenjar yang telah diswab disimpan dalam pot steril yang berisi BNF 10% untuk pembuatan preparat pemeriksaan *flowcytometry*.

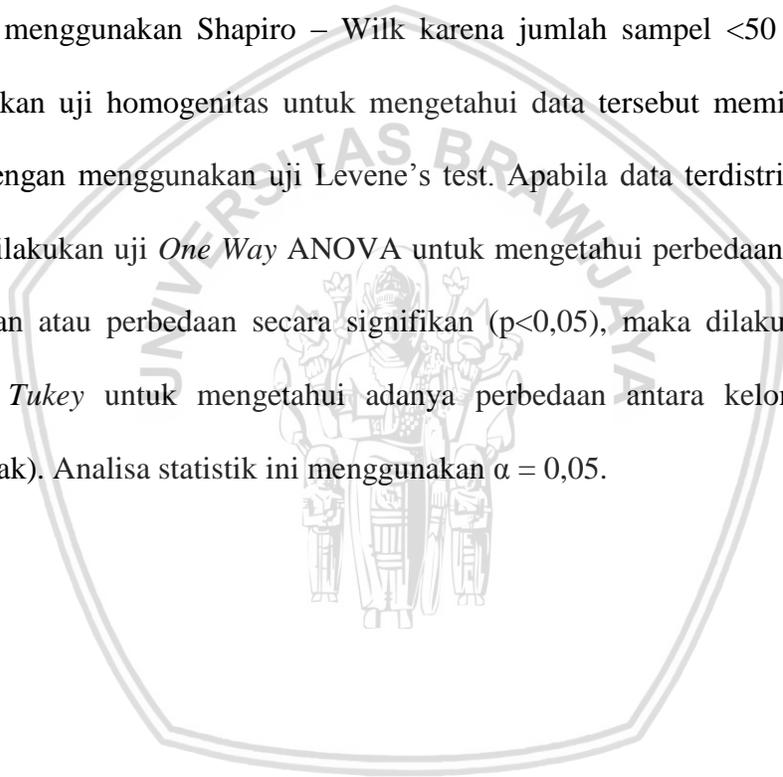
4.7.8 Flowcytometry

Ekspresi sel T CD-4 dan sel T CD-8 dilihat dengan menggunakan alat *flowcytometry*. Sampel yang digunakan adalah organ limpa. Organ limpa yang telah dikoleksi dihaluskan lalu dimasukan ketabung propilen, disentrifugasi dengan kecepatan 2500 rpm selama 5 menit dengan suhu 4⁰C sampai didapat bentukan padat (pellet). *Flowcytometry* dimulai dengan menambahkan antibodi mouse anti - CD4 dan mouse anti - CD8 pada pellet. Ditambahkan 1 ml PBS dan ditempatkan pada kuvet floctometer dan diruning. *Floctometer* akan menghitung jumlah sel

yang mengekspresikan dan jumlah sel yang terdeteksi oleh label antibodi. Hasil yang diperoleh diolah dengan program BD cell quest Pro.

4.8 Analisa Data

Analisa data dari ekspresi sel T CD-4 dan sel T CD-8 melalui uji statistik *one way* ANOVA terhadap jumlah ekspresi sel T CD4 dan sel T CD8, jenis hipotesa komparatif dan jumlah kelompok perlakuan lebih dari 2 kelompok. Analisa *One Way* ANOVA didahului dengan uji distribusi data menggunakan Shapiro – Wilk karena jumlah sampel <50 (Dahlan, 2011). Selanjutnya dilakukan uji homogenitas untuk mengetahui data tersebut memiliki varian yang sama atau tidak dengan menggunakan uji Levene's test. Apabila data terdistribusi normal dan homogeny maka dilakukan uji *One Way* ANOVA untuk mengetahui perbedaan rata – rata antar kelompok perlakuan atau perbedaan secara signifikan ($p < 0,05$), maka dilakukan uji lanjutan menggunakan uji *Tukey* untuk mengetahui adanya perbedaan antara kelompok perlakuan (signifikan atau tidak). Analisa statistik ini menggunakan $\alpha = 0,05$.



BAB V HASIL DAN PEMBAHASAN

5.1 Pemeriksaan Mastitis Klinis

Pembuatan hewan model mastitis dilakukan dengan injeksi *S. aureus* pembentuk biofilm secara *intramammae* dengan dosis $1,4 \times 10^2$ CFU pada kelompok kontrol positif, kelompok perlakuan satu, kelompok perlakuan dua dan kelompok perlakuan tiga. Injeksi dilakukan satu kali menggunakan *syringe* 1 cc dan *needle* 31 gauge. Pemeriksaan hewan model mastitis dilakukan setiap harinya dengan mengamati keaktifan, nafsu makan dan minum serta tanda inflamasi pada *mammae*. Mencit model mastitis klinis menunjukkan gejala mastitis pada hari kedua *post* injeksi seperti nafsu makan berkurang, kurang aktif, *mammae* mengalami pembengkakan dan berwarna merah yang merupakan tanda-tanda inflamasi.

Gejala klinis mastitis klinis seperti pembengkakan *mammae* dan perubahan warna kulit *mammae* menjadi lebih merah merupakan akibat vasodilatasi pembuluh darah karena adanya infeksi *S. aureus* pada *mammae* mencit. Hasil pengamatan mikroskopis menunjukkan bahwa adanya kerusakan sel epitel, penyempitan lumen alveoli dan infiltrasi sel polimorfonuklear (PMN) yang merupakan tanda hewan model telah mastitis.

Staphylococcus aureus yang diinduksikan ke mencit mampu menyebabkan mastitis yang ditandai dengan adanya tanda-tanda inflamasi pada ambing mencit. Berdasarkan hasil penelitian yang dilakukan, terdapat perbedaan antar kelompok perlakuan dilihat dari peradangan yang terjadi ditandai dengan adanya pembengkakan dan abnormalitas pada ambing mencit.

Setelah dilakukan induksi *S. aureus* dan dilakukan terapi dengan menggunakan ekstrak etanol daun beluntas maka pada hari ke 18 dilakukan pembedahan mencit dan pengambilan organ limpa sebagai sampel organ untuk pengamatan parameter yaitu CD4 dan CD8.

Hasil penelitian dengan menggunakan mencit yang diberikan perlakuan

Perlakuan 1: 5 ekor dengan injeksi *S. aureus* 10^2 CFU/ml pada Hari ke 12,

terapi ekstrak etanol daun beuntas dengan dosis 2,625 mg/25 gram

BB mencit pada Hari ke 14-17

Perlakuan 2: 5 ekor dengan injeksi *S. aureus* 10^2 CFU/ml pada Hari ke 12,

terapi ekstrak etanol daun beuntas dengan dosis 26,25 mg/25 gram

BB mencit pada Hari ke 14-17

Perlakuan 3: 5 ekor dengan injeksi *S. aureus* 10^2 CFU/ml pada Hari ke 12,

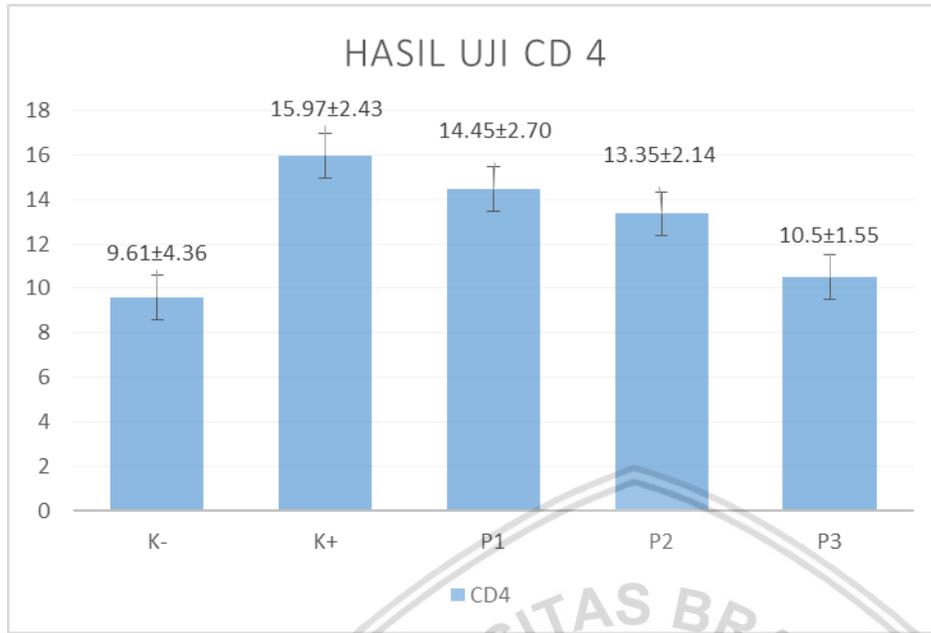
terapi ekstrak etanol daun beuntas dengan dosis 52,5 mg/25 gram BB

mencit pada Hari ke 14-17

Pembedahan pada mencit dilakukan pada hari ke 18 untuk diambil organ limpa sebagai organ untuk pengamatan sel CD4 dan CD8 melalui uji *flowcytometry*

5.2 Ekspresi Sel T CD4 Hasil Terapi Ekstrak Etanol Daun Beluntas Mencit (*Mus musculus*) Mastitis Subklinis Hasil Injeksi *S. aureus*

Hasil uji normalitas dan homogenitas didapatkan data terdistribusi normal dan homogen (**Lampiran 10**). Sehingga dilakukan uji lanjutan untuk mengukur jumlah relatif dari sel T CD4 dengan menggunakan alat *flowcytometri*. Selanjutnya dilakukan Uji Tukey (**Gambar 5.2**) dan analisa secara statistik dengan menggunakan *One Way ANOVA* (**Tabel 5.2**), didapatkan hasil pengukuran yang berbeda secara signifikan ($p < 0,05$) antar kelompok perlakuan (**Lampiran 10**).



Gambar 5.2 Hasil *Post Hoc* Uji Tukey produksi sel T CD4

Hasil analisis *flowcytometry* menggunakan organ limpa menunjukkan produksi sel T CD4 meningkat pada kelompok kontrol positif (mencit diinjeksi *s. aureus*) dibandingkan dengan kelompok negatif (kelompok mencit sehat) yang ditandai dengan adanya peningkatan produksi T CD4. Peningkatan ekspresi sel T CD4 pada kontrol positif terbukti lebih tinggi bila dibandingkan dengan kontrol negatif. Hal tersebut menunjukkan bahwa setelah pemberian *S. aureus* di *mammae* mencit (*Mus musculus*) terjadi proses radang. Proses radang tersebut diduga karena *S. aureus* yang bisa membentuk biofilm.

Hasil *Post hoc* dengan uji Tukey didapatkan hasil bahwa kelompok perlakuan P3 (dosis terapi 52,5 mg/25 gram BB) berbeda signifikan dengan kelompok kontrol positif ($<0,05$) dan tidak berbeda signifikan dengan kelompok kontrol negatif (**lampiran 10**). Berdasarkan rata-rata perlakuan 1 dengan dosis terapi 2,625 mg/25 gram BB dan perlakuan 2 dengan dosis terapi 26,25 mg/25 gram BB terjadi penurunan produksi sel T CD4 karena efek ekstrak etanol daun beluntas. Perlakuan P1 dan P2 memiliki perbedaan yang signifikan dengan kelompok K+ dan K- ($P<0,05$).

Namun, rata-rata penurunan produksi sel T CD4 pada P3 lebih mendekati nilai presentase kontrol negatif

Jumlah Rata-rata sel T CD4 Sebagai Respon Terapi Ekstrak Etanol Daun Beluntas pada Mencit (*Mus musculus*) Mastitis yang Diinduksi *S. aureus*

Tabel 5.2 Hasil *Post hoc* Uji Tukey sel T CD4

Kelompok Perlakuan	Rataan Jumlah Sel T CD4 (%)
Kontrol negatif (K-)	9,61 ± 4,36 ^a
Kontrol Positif (K+)	15,97 ± 2,43 ^b
P1 Dosis 2,625mg/25 gram BB	14,45 ± 2,70 ^{ab}
P2 Dosis 26,25mg/25 gram BB	13,35 ± 2,14 ^{ab}
P3 Dosis 52,5mg/25 gram BB	10,5 ± 1,55 ^a

Hasil penelitian menunjukkan bahwa pemberian ekstrak etanol daun beluntas (*Pluchea indica* L) yang mengandung zat aktif berupa flavonoid dan tanin memberikan efek antiinflamasi yang ditandai dengan adanya rata-rata penurunan presentase sel T CD4 pada dosis 2,625 mg/25 gram BB, dosis 26,25 mg/25 gram BB dan dosis 52,5 mg/25 gram BB.

Data yang diperoleh dari hasil uji statistic *one way* ANOVA didapatkan *p-value* sebesar 0,000 ($p < 0,05$) dengan tingkat kepercayaan 95% yang menunjukkan adanya perbedaan yang nyata. Perbedaan antar perlakuan diketahui dengan uji lanjutan yaitu uji *post hoc* Tukey yang dinyatakan dengan notasi huruf. **Tabel 5.2** memperlihatkan jumlah relatif sel T CD4 pada mastitis mencit (*Mus musculus*) akibat induksi *S. aureus* yang diterapi ekstrak etanol daun beluntas, yaitu rata-rata dengan rataaan paling rendah pada kelompok P3. Ekspresi sel T CD4 tertinggi ditunjukkan pada kelompok kontrol positif, hal ini sejalan dengan penelitian yang dilakukan oleh Kobayasi *et al* (2011) yang menyatakan bahwa pada mencit yang diinduksikan dengan *S. aureus* akan meningkatkan jumlah sel T CD4 karena terjadinya inflamasi pada daerah *mammae*.

Perbedaan notasi pada tiap pemberian ekstrak etanol daun beluntas menunjukkan bahwa perlakuan berpengaruh nyata ($P < 0,05$) terhadap ekspresi sel T CD4 mencit. Kondisi tersebut mengindikasikan bahwa ekspresi sel T CD4 signifikan dipengaruhi oleh terapi ekstrak etanol daun beluntas pada mastitis mencit (*Mus musculus*) yang diinduksi *S. aureus*. Melalui uji lanjut *post hoc test* Tukey diketahui bahwa kelompok kontrol positif menghasilkan ekspresi sel T CD4 tertinggi yaitu 15,97% dibandingkan dengan perlakuan lain dari mulai kelompok kontrol negatif dengan jumlah relatif 9,61% kelompok P1 dengan jumlah relatif 14,45, kelompok P2 dengan jumlah relatif 13,35% dan kelompok P3 dengan jumlah relatif 10,5%. Dari hasil yang telah diperoleh menunjukkan bahwa P3 tidak berbeda nyata dengan kontrol negatif dan berbeda nyata dengan kontrol positif. Hal tersebut menunjukkan adanya proses penyembuhan akibat terapi ekstrak etanol daun beluntas pada kondisi awal.

Perlakuan kontrol positif menunjukkan hasil yang signifikan karena faktor virulensi disebabkan oleh *Lipopolisakarida* (LPS), *arginin* dan *lysin gingipain* (Imamura, 2003). LPS dari *S. aureus* bersifat endotoksin yang merangsang terjadinya peradangan pada hospes berupa peningkatan ekspresi sitokin proinflamasi, seperti IL-1, IL-6, dan IL-8 yang memicu kerusakan jaringan endotel pada *mammae*. Produksi sitokin proinflamasi seperti IL-1, IL-6 dan IL-8 tersebut sebelumnya diawali dengan aktivasi sel T dari proliferasi sel T CD4 yang berkembang menjadi sel T *helper* 1 dan sel T *helper* 2 yang selanjutnya menjalankan fungsi yaitu sel Th1 akan menghasilkan TNF- α , IFN- γ , dan IL-2, dan Th2 akan menghasilkan diantaranya IL-1 dan IL-6 (Baratawidjaja and Iris, 2010). Sebagaimana yang dilaporkan oleh Mysak (2014), mengenai *S. aureus*, menyatakan bahwa *S. aureus* berkontribusi pada patogenesis mastitis dengan menginduksi sitokin proinflamasi dengan sangat tinggi yaitu IL-1 dan IL-6 oleh sel T CD4+. Sejalan dengan hal tersebut, Kobayashi (2011) telah melakukan penelitian mengenai ekspresi sel

T CD4 hasil induksi *S. aureus* yang menunjukkan peningkatan ekspresi sel T CD4 pada hari kedelapan

Data yang diperoleh dari masing-masing perlakuan P1 menunjukkan 5 ekor dengan injeksi *S. aureus* $1,4 \times 10^2$ CFU/ml pada Hari ke 12, terapi ekstrak etanol daun beuntas dengan dosis 2,625 mg/25 gram BB mencit pada Hari ke 14-17 diperoleh hasil dari uji *flowcytometry* $14,45 \pm 2.7\%$ ekspresi sel T CD4 yang mengindikasikan adanya proses penyembuhan. Hal itu dikarenakan pada ekstrak etanol daun beluntas mempunyai kandungan flavonoid dan tanin, adanya perbedaan rata-rata pada hasil dikarenakan jumlah dosis yang diberikan pada masing-masing perlakuan berbeda. Tujuan pemberian dosis yang berbeda ini agar dapat melihat dosis terbaik dan efektif untuk terapi mastitis.

Data yang diperoleh menunjukkan bahwa pada masing-masing perlakuan P2 5 ekor dengan injeksi *S. aureus* $1,4 \times 10^2$ CFU/ml pada Hari ke 12, terapi ekstrak etanol daun beuntas dengan dosis 26,25 mg/25 gram BB mencit pada Hari ke 14-17 diperoleh dari hasil uji *flowcytometry* $13,35 \pm 2.14\%$ ekspresi sel T CD4 yang menunjukkan adanya proses penyembuhan berkala yang menunjukkan adanya pengurangan ekspresi dibandingkan dengan P1.

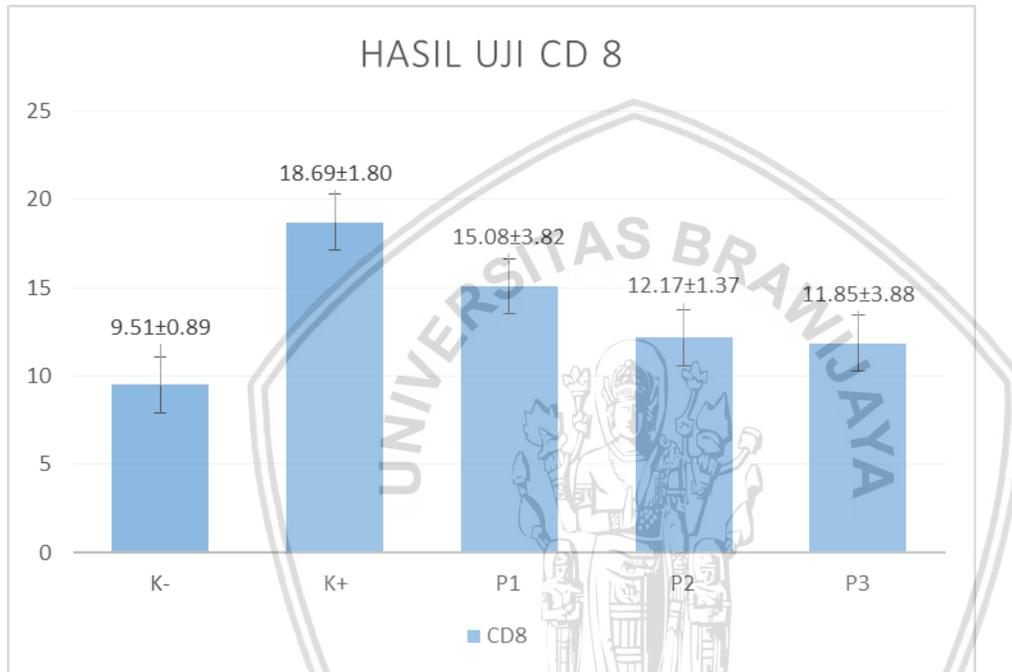
Data yang diperoleh dari P3 5 ekor dengan injeksi *S. aureus* $1,4 \times 10^2$ CFU/ml pada Hari ke 12, terapi ekstrak etanol daun beuntas dengan dosis 52,5 mg/25 gram BB mencit pada Hari ke 14-17. Diperoleh hasil dari *flowcytometry* $10,5 \pm 1.55\%$. Berdasarkan hasil analisa data dalam penelitian ini dipilih P3 sebagai sebagai jumlah pemberian ekstrak etanol daun beluntas yang paling baik karena memiliki rataan jumlah relatif sel T CD4 terendah yaitu 10,5 yang memiliki nilai mendekati pada kontrol negative. Hal ini dikarenakan sel T CD4 yang telah aktif akan berdeferensiasi sesuai dengan stimulan terutama sitokin yang dihasilkan pada saat beakteri masuk ke dalam tubuh hospes. Sel T CD4 akan berdeferensiasi menjadi subset lain yaitu Th1 dan

Th2 yang berperan untuk menghasilkan respon inflamasi dan bertanggung jawab untuk menyerang antigen intraselular serta sintesis sitokin yang akan mengaktifkan fungsi imun yaitu sel T CD8, sel B, makrofag, dan sel *natural-killer* (NK) (Baratawidjaja and Iris, 2010). P3 hasil terapi ekstrak etanol daun beluntas pada mencit (*Mus musculus*) dengan kandungan flavonoid dan tanin yang mempunyai efek antiinflamasi efektif untuk menurunkan inflamasi yang ditandai dengan menurunnya jumlah sel T CD4 akibat infeksi *S. aureus*. Menurunnya jumlah sel T CD4 pada kelompok perlakuan P1, P2 dan P3 diduga karena efek terapi dari ekstrak etanol daun beluntas yang diberikan. Efek terapi yang terjadi diduga berupa berkurangnya inflamasi yang terjadi pada daerah *mammae*. Sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Seimour *et al.*, (2000) yang menyatakan bahwa penurunan ekspresi sel T CD4 dapat terjadi akibat proses penyembuhan yang terjadi pada daerah *mammae*.

Mekanisme kerja kandungan flavonoid pada ekstrak etanol daun beluntas yang diberikan pada mencit dapat membunuh *S. aureus* dengan cara melisis dinding sel bakteri selain itu Ekstrak etanol daun beluntas dengan kandungan flavonoid ini diketahui memiliki antiinflamasi yang tinggi sehingga dapat mengurangi peradangan pada *mammae*. Pada penelitian ini, ekstrak etanol daun beluntas yang digunakan adalah daun beluntas yang diekstrak dengan etanol 96% dan penyebab mastitis yang digunakan ialah induksi *S. aureus* yang dapat membentuk biofilm. Oleh karena itu, penurunan ekspresi sel T CD4 diduga selain karena proses imunitas yang terjadi dalam tubuh juga karena ekstrak etanol daun beluntas yang diberikan mampu mengubah suasana lingkungan kelenjar *mammae* menjadi lebih asam sehingga *S. aureus* tidak dapat bertahan hidup didukung dengan kandungan tanin sebagai bakteriostatik dan bakteriosidal.

1.3 Ekspresi Sel T CD8 Hasil Terapi Ekstrak Etanol Daun Beluntas Mencit (*Mus musculus*) Mastitis Subklinis Hasil Injeksi *S. aureus*.

Hasil uji normalitas dan homogenitas didapatkan data terdistribusi normal dan homogen (**Lampiran 11**). Sehingga dilakukan uji lanjutan untuk mengukur jumlah relatif dari sel T CD8 dengan menggunakan alat *flowcytometri*. Selanjutnya dilakukan Uji Tukey (**Gambar 5.3**) dan analisa secara statistik dengan menggunakan *One Way ANOVA* (**Tabel 5.3**), didapatkan hasil pengukuran yang berbeda secara signifikan ($P < 0,05$) antar kelompok perlakuan (**Lampiran 11**).



Gambar 5.3 Hasil *Post Hoc* Uji Tukey produksi sel T CD8

Eksresi sel T CD8 hasil terapi ekstrak etanol daun beluntas pada mastitis mencit yang diinduksi *S. aureus* dapat dilihat pada **Tabel 5.3**. **Tabel 5.3** memperlihatkan adanya penurunan jumlah relatif sel T CD8 sebagai respon terhadap terapi ekstrak etanol daun beluntas pada mastitis mencit yang diinduksi *S. aureus* dibandingkan dengan perlakuan kontrol negatif. Keadaan tersebut mengindikasikan bahwa semakin tinggi jumlah pemberian ekstrak etanol daun beluntas yang digunakan untuk terapi pada mastitis mencit, jumlah relatif sel T CD8 semakin rendah. Dengan demikian ekstrak etanol daun beluntas cukup efektif untuk digunakan sebagai pengobatan pada mastitis mencit yang diinduksi *S. aureus*.

Jumlah relatif sel T CD8 sebagai respon terhadap terapi ekstrak etanol daun beluntas pada mastitis mencit (*Mus musculus*) yang diinduksi *S. aureus* dilihat dengan menggunakan *flowcytometri* dan dianalisa menggunakan *one way ANOVA*. Hasil menunjukkan berbeda signifikan ($P < 0,05$) antar kelompok perlakuan (**Tabel 5.3**).

Gambar 5.3 Hasil *Post hoc* Uji Tukey produksi sel T CD8

Kelompok Perlakuan	Rataan Jumlah Sel T CD8 (%)
Kontrol negatif (K-)	9,51 ± 0,89 ^a
Kontrol Positif (K+)	18,7 ± 1,80 ^c
P1 Dosis 2,625mg/25 gram BB	15,1 ± 3,82 ^{bc}
P2 Dosis 26,25mg/25 gram BB	12,1 ± 1,37 ^{ab}
P3 Dosis 52,5mg/25 gram BB	11,9 ± 3,88 ^{ab}

Hasil *post hoc* dengan uji Tukey didapatkan hasil pada kontrol negatif 9,51% dan kontrol positif 18,7%. (**lampiran 11**). Berdasarkan rata-rata P1 dengan dosis terapi 2,625 mg/25 gram BB diperoleh hasil 15,1% hal tersebut menunjukkan bahwa P1 berbeda signifikan dengan kontrol negatif namun tidak berbeda signifikan dengan kontrol positif. P2 dengan dosis terapi 26,25 mg/25 gram BB berbeda signifikan dengan kontrol negatif namun tidak berbeda signifikan dengan kontrol positif. Namun, rata-rata penurunan produksi sel T CD8 pada P3 mendekati nilai presentase kontrol negatif. Hasil yang diperoleh dari terapi ekstrak etanol daun beluntas P3 (dosis terapi 52,5 mg/25 gram BB) mempunyai nilai 11,9% berbeda signifikan dengan kontrol positif namun tidak berbeda signifikan dengan kontrol negatif ($P < 0,05$). Hal tersebut menunjukkan adanya penyembuhan dengan ditandai notasi yang menunjukkan ke kontrol negatif walaupun kurang signifikan.

Data yang diperoleh dari hasil uji statistik ANOVA didapatkan *p-value* sebesar 0,000 ($p < 0,05$) dengan tingkat kepercayaan 95% yang menunjukkan adanya perbedaan yang nyata.

Perbedaan antar perlakuan diketahui dengan uji lanjutan yaitu uji *Tukey* yang dinyatakan dengan notasi huruf. **Tabel 5.3** memperlihatkan jumlah relatif sel T CD8 pada mastitis mencit (*Mus musculus*) akibat induksi *S. aureus* yang diterapi ekstrak etanol daun beluntas rata-rata paling rendah pada kelompok P3. Ekspresi sel T CD8 tertinggi ditunjukkan pada kelompok kontrol positif, hal ini sejalan dengan penelitian yang dilakukan oleh Kobayasi *et al* (2011) yang menyatakan bahwa pada mencit yang diinduksikan dengan *S. aureus* akan meningkatkan frekuensi sel T CD8 karena terjadinya inflamasi pada daerah *mammae*.

Sel T CD8 bekerja untuk memusnahkan sel yang telah terinfeksi oleh *S. aureus* melalui penurunan ekspresi *Major Histocompatibility Complex I* (MHC I). MHC I akan diekspresikan pada permukaan sel yang memiliki inti dan pada fragmen peptida yang berasal dari protein intraseluler. Sel T CD8 yang belum matang membutuhkan proses aktivasi dan berdiferensiasi untuk dapat menjalankan tugasnya sebagai sel efektor yang dapat menghancurkan dan memusnahkan sel yang telah terinfeksi untuk mengurangi penyebaran infeksi. MHC I akan mengaktivasi sel T CD8 dengan mengenali peptida oleh bantuan sel T helper yang telah diproduksi sebelumnya. Sel yang telah terinfeksi oleh *S. aureus* akan dicerna oleh APC, utamanya sel dendritik kemudian akan terjadi proses *cross-presented* oleh APC. APC akan mempresentasikan *S. aureus* dari sitosol sebagai kompleks dengan MHC I (Abbas *et al.*, 2007). Pemusnahan sel oleh sel T CD8 berfungsi untuk mencegah patogenitas dari *S. aureus* dengan cara memasukkan perforin ke dalam membran sel target untuk menghasilkan porus melalui jalan *granzyme* dan menyebabkan reaksi *granule-associated osmotic lysis* pada sel target (Kumar and Clark, 2007).

Jumlah relatif sel T CD8 sebagai terapi ekstrak etanol daun beluntas pada mastitis mencit yang diinduksi *S. aureus* menunjukkan rata-rata yang menurun dibandingkan dengan kontrol positif,

peningkatan jumlah relatif sel T CD8 yang diperoleh pada penelitian ini sama halnya pada penelitian yang dilakukan oleh Petit *et al.*, (2001) yang menyatakan bahwa pada kejadian mastitis ekspresi sel T CD8 juga akan mengalami peningkatan yang diikuti dengan peningkatan sitokin diantaranya IFN- γ dan IL-4. Berdasarkan hasil uji statistik diketahui bahwa perlakuan P3 berpengaruh nyata ($P < 0,05$) terhadap ekspresi sel T CD8 mencit dibandingkan dengan K-. Hal ini menunjukkan bahwa ekspresi sel T CD8 dipengaruhi secara signifikan oleh ekstrak etanol daun beluntas pada mastitis mencit yang diinduksi *S. aureus*. Hasil *Post hoc* dengan uji Tukey diketahui bahwa kelompok kontrol positif menghasilkan ekspresi sel T CD8 dengan jumlah relatif 18,7 yang nyata lebih tinggi ($P < 0,05$) dibandingkan dengan perlakuan P1 (kontrol negatif) dengan jumlah relatif 9,51 dan kelompok P1 dengan jumlah relatif 15,1, tetapi tidak berbeda nyata ($P > 0,05$) dengan kelompok P2 dengan jumlah relatif 12,1 dan kelompok P3 dengan jumlah relatif sel T CD8 sebesar 11,9. Peningkatan ekspresi sel T CD8 pada kontrol positif dapat diartikan bahwa *S. aureus* yang diinduksikan pada mencit mampu merangsang terjadinya proses radang didalam tubuh sehingga memicu aktivasi dari sel T CD8 seperti yang telah dijelaskan sebelumnya. Sel T CD8 akan berfungsi sebagai sel T sitotoksik atau supresor yang berinteraksi dengan molekul MHC I bersama dengan antigen. Sel T sitotoksik akan memusnahkan sel dengan merangsang apoptosis pada sel target sedangkan sel T supresor akan meregulasi respon imun yang lain dengan cara melepaskan faktor-faktor solubel yang bertindak atas limfosit B untuk menghasilkan antibodi (Kumar *and* Clark, 2005).

Data yang diperoleh dari masing-masing perlakuan P1 menunjukkan 5 ekor dengan injeksi *S. aureus* $1,4 \times 10^2$ CFU/ml pada Hari ke 12, terapi ekstrak etanol daun beuntas dengan dosis 2,625 mg/25 gram BB mencit pada Hari ke 14-17 diperoleh hasil dari uji *flowcytometry* $15,1 \pm 3,82\%$ ekspresi sel T CD8 yang mengindikasikan adanya proses penyembuhan. Hal itu

dikarenakan pada ekstrak etanol daun beluntas mempunyai kandungan flavonoid dan tanin, adanya perbedaan rata-rata pada hasil dikarenakan jumlah dosis yang diberikan pada masing-masing perlakuan berbeda. Tujuan pemberian dosis yang berbeda ini agar dapat melihat dosis terbaik dan efektif untuk terapi mastitis.

Data yang diperoleh menunjukkan bahwa pada masing-masing perlakuan P2 5 ekor dengan injeksi *S. aureus* $1,4 \times 10^2$ CFU/ml pada Hari ke 12, terapi ekstrak etanol daun beuntas dengan dosis 26,25 mg/25 gram BB mencit pada Hari ke 14-17 diperoleh dari hasil uji *flowcytometry* $12,1 \pm 1.37\%$ ekspresi sel T CD8 yang menunjukkan adanya proses penyembuhan berkala yang menunjukkan adanya pengurangan ekspresi dibandingkan dengan P1. Hal ini dapat terjadi karena pengaruh pemberian terapi dengan dosis yang semakin banyak maka akan memberikan efek yang signifikan dalam proses penyembuhan.

Data yang diperoleh dari P3 5 ekor dengan injeksi *S. aureus* $1,4 \times 10^2$ CFU/ml pada Hari ke 12, terapi ekstrak etanol daun beuntas dengan dosis 52,5 mg/25 gram BB mencit pada Hari ke 14-17 diperoleh hasil dari *flowcytometry* $11,9 \pm 3.88\%$. P3 dengan jumlah pemberian ekstrak etanol daun beluntas yang paling baik karena memiliki rataan jumlah relatif sel T CD8 terendah dan memiliki nilai yang mendekati kontrol negatif dan berbeda signifikan dengan kontrol positif, hal tersebut meningkaskan adanya penurunan jumlah sel T CD8 menuju ke kondisi normal. Sifat flavonoid sebagai imunomodulator dapat berubah menjadi immunosupresan terhadap rata-rata indeks daya fagosit makrofag. P3 hasil terapi ekstrak etanol daun beluntas pada mencit (*Mus musculus*) dapat menurunkan jumlah sel T CD8 akibat infeksi *S. aureus* sejalan dengan hasil yang ditunjukkan pada penurunan jumlah sel yang mengekspresikan sel T CD8. Penurunan sel T CD8 kemungkinan disebabkan oleh adanya intensitas inflamasi yang menurun akibat adanya terapi ekstrak etanol daun beluntas, hal tersebut akan mengakibatkan

penurunan sel T CD8 dalam mengenali kompleks antigen MHC-1 yang dipresentasikan oleh APC, sel T CD8 berperan dalam menyingkirkan sel yang terinfeksi oleh bakteri intraselular. Sel Tc menimbulkan sitolisis melalui poriferin, apoptosis, TNF- α dan berjalan beriringan dengan sel T CD4 untuk memacu peningkatan produksi Th1 dan Th2.

Mekanisme kerja penurunan inflamasi yaitu ekstrak etanol daun beluntas masuk kedalam saluran *mammae* dan akan berinteraksi dengan sel leukosit komponen imunitas di lapisan epitel dan dikenali sebagai antigen oleh mikrofold sel kemudian akan ditangkap oleh sel B dan sel T sehingga terjadilah proliferasi sel B dan sel T dan bermigrasi menuju sistem sirkulasi limfatik dan menyebar sistemik melalui saluran darah sehingga akan berada di semua lapisan kelenjar *mammae*, limpa, hati. Hal ini menunjukkan bahwa ekstrak etanol daun beluntas mampu meningkatkan imunitas (Perdigon *et al.*, 2001). Dijelaskan pula bahwa ekstrak etanol daun beluntas mampu mengaktivasi pembentukan sel T killer yang merupakan leukosit yang menghasilkan sitotoksik untuk membunuh patogen. Suriasih (2015) menjelaskan daun beluntas yang diuji cobakan pada mencit terbukti dapat digunakan sebagai antibakterial karena mampu mengurangi tingkat inflamasi.

Menurunnya ekspresi sel T CD8 pada mencit mastitis yang diterapi menggunakan ekstrak etanol daun beluntas berkaitan dengan berkurangnya inflamasi yang terjadi pada daerah *mammae* diduga karena ekstrak etanol daun beluntas dengan kandungan flavonoid dan tanin yang bekerja sebagai bakteriostatik mampu menghambat pertumbuhan *S. aureus* serta tanin mampu membunuh *S. aureus* dengan cara merusak permeabilitas membran sel sehingga jumlah bakteri yang merangsang respon dalam tubuh pun menjadi lebih sedikit. Kandungan tanin pada ekstrak etanol daun beluntas juga memiliki fungsi biologis yaitu sebagai antimikroba. Tanin akan menghambat bakteri dengan mengikat zat-zat besi yang dibutuhkan bakteri dalam bertahan hidup

dan pada bakteri gram negatif tanin secara alami akan bersifat bakteriosidal yang akan mematikan bakteri tersebut. Tanin pada ekstrak etanol daun beluntas diketahui bermanfaat sebagai anti biofilm alami yang dapat membantu menekan produksi biofilm pada bakteri di dalam tubuh. Antibiofilm akan bekerja dengan melakukan kontak langsung dengan membran sel sehingga merusak permeabilitas membran dan terjadi kebocoran dan sel tidak mampu bertahan hidup, kebocoran tersebut yang mengakibatkan sel (bakteri) tidak dapat bertahan dan mengalami kematian. Ogunbanwo *et al.*, (2003) menyebutkan bahwa anti biofilm yang terdapat pada ekstrak etanol daun beluntas dapat menghambat pertumbuhan bakteri patogen.



BAB VI PENUTUP

6.1 Kesimpulan

Kesimpulan dari penelitian ini adalah:

1. Ekstrak etanol daun beluntas (*Pluchea indica L*) dapat menurunkan mastitis pada mencit (*Mus musculus*) mastitis subklinis hasil induksi *S. aureus* yang ditandai dengan penurunan jumlah sel yang mengekspresikan CD4 pada kelompok perlakuan 3 dengan dosis terbaik 52,5 mg/25 gram BB mencit.
2. Ekstrak etanol daun beluntas (*Pluchea indica L*) dapat menurunkan mastitis pada mencit (*Mus musculus*) mastitis subklinis hasil induksi *S. aureus* yang ditandai dengan penurunan jumlah sel yang mengekspresikan CD8 pada kelompok perlakuan 3 dengan dosis terbaik 52,5 mg/25 gram BB mencit.

6.2 Saran

1. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai efek toksik dari ekstrak etanol daun beluntas (*Pluchea indica L*) yang memiliki efek anti inflamasi dan antioksidan pada penyakit mastitis.
2. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai dosis optimum pengobatan dari ekstrak etanol daun beluntas (*Pluchea indica L*).

DAFTAR PUSTAKA

- Abbas, A. K., A. H. Lichtman, and J. S. Pober. 2000. *Cytokines in Cellular and Molecular Immunology 4th ed.* Philadelphia. WB Saunders: 233-267.
- Abbas, A. K., and A. H. Lichtman. 2005. *Basic Immunology: Function and Disorder of The Immun System.* China: Elsevier. Pp 134-349.
- Abeer, E., El-Metwally and A. E. Hana.. 2008. Mastitis Pathogens in Relation to Histopathological Changes in Buffalo Udder Tissues and Supramammary Lymph Nodes. *Egypt. J. Comp. Path. & Clinic. Path.* Vol. 21 (4): 190 – 208.
- Agoes, Azwar. 2010. *Tanaman Obat Indonesia.* Jakarta: Salemba Medika.
- Akbar, B. 2010. *Tumbuhan dengan Kandungan Senyawa Aktif yang Berpotensi sebagai bahan Antifertilitas,* Jakarta: Adabia Press.
- Archer, N. K., M. J. Mazaitis, J. W. Costerton, J.G. Leid, M.E. Powers, M. E. Shirtliff. 2011. *Staphylococcus aureus* Biofilm Properties, Regulation and Roles in Human Disease. Landes Bioscience. *Virulence* 2:5, 445-459.
- Arciola, C.R., D. Campoccia, L. Montanaro. 2001. Presence of *icaA* dan *icaD* genes and Slime Production in a Collection of Staphylococcal strains from catheter-associated infections. *J. Clin. Microbiol.* 39, 2151-2156.
- Arciola, C. R., D. Campoccia, P. Speziale, L. Montanaro, J. W. Costerton. 2002. Biofilm Formation *Staphylococcus aureus* Implant Infection. A Review of Molecular Mechanism and Implication for Biofilm-Resistant. Elsevier. *Biomaterial*, Vol 33, Issue 26.
- Ardiansyah, L. Nuraida dan N. Andarwulan. 2002. Aktivitas Antibakteri Ekstrak Daun Beluntas (*Pluchea indica* L.). Malang: *Prosiding Seminar Tahunan PATPI.*
- Ardiansyah, L. Nuraid, dan N. Andarwulan, 2003. Aktivitas Antibakteri Ekstrak Daun Beluntas (*Pluchea indica* L.) dan Stabilitas Aktivasnya pada Berbagai Konsentrasi Garam dan Tingkat pH. *Jurnal Teknologi dan Industry Pangan.* Vol. XIV, No 2.
- Baratawidjaja, K. G dan I. Rengganis. 2009. *Imunologi Dasar.* Balai Penerbit Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. Jakarta.
- Basuki, P. S. 2006. *Infeksi Antibakteri Intraseluler.* Surabaya. FK Unair.
- Brouillette, Eric., Grondin, Giles, Lefebvre, and Celine,. 2004. Mouse mastitis model of infection for antimicrobial compound efficacy studies against intracellular and extracellular forms of *Staphylococcus aureus.* *Veterinary Microbiology* 101. 253-262.



- Cappucino, J. G., and N. Sherman. 1998. *Microbiology: A Laboratory Manual. 5th Edition*. California: Benjamin/Cummings Science Publishing.
- Cortes, M. E., J. C. Bonilla, and R. D. Sinisterra. 2011. *Biofilm Formation, Control and Novel Strategies for Eradication. Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances*. Mendezvilas.
- Cramton, S.E., M. Ulrich, Goatz, and G. Doring. 2001. Anaerobic Condition Induce Expression of Polysaccharide Intercellular Adhesin in *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermis*. *Infect Immun* 69:4079-4085.
- Dalimartha, S. 1999. *Atlas Tumbuhan Obat Indonesia*. Jilid I. Jakarta. Trubus Agriwidya.
- Davey and O'toole, 2000. Microbial Biofilm: from Ecology to Molecular Genetics. *Mic and Mol. Reviews*. 64(4): 847–867.
- Department Kesehatan RI, 2003. *Indikator Indonesia Sehat*. Jakarta.
- Imamura, T. 2003. *Staphylococcus aureus* Penyebab Mastitis. Vol.74: 111-8.
- Kobayashi, R., M. Wada., K. Kataoka., and M. Yamamoto. 2011. Induction of IL-10-Producing CD4+ T-Cells in Chronic Periodontitis. *J Dent Res. Japan* 2011 May; 90(5): 653-658.
- Kumar, P., and M. Clark. 2007. *Clinical Medicine*. 6th ed. Elsevier Saunders. London.
- Mysak, J., S. Podzimek, P. Sommerova, Y. Lyuyami, J. Bartova, T. Janatova, J. Prochazkova, and J. Duskova. 2014. *Staphylococcus aureus*: Major Pathogen Overview. *Journal of Immunology Research*, Volume 2014 476068.
- Ogunbanwo, S.T., A.I. Sanni and A. A. Onilude. 2003. Influence Of Cultural Conditions On The Production Of Bacteriocins By *Lactobacillus Brevis* OG1. *Afric. J. Biotechnol*, 2 (7): 179- 184.
- Permadani, and Ayu. I., 2014. *Daya Hambat Ekstrak Daun Beluntas (Pluchea indica l.) Menggunakan Pelarut Etanol terhadap Pertumbuhan Bakteri Staphylococcus aureus dan Esherichia coli Penyebab Mastitis pada Sapi Perah*. Malang.
- Petit, M. D., E. Hovenkamp, D. Hamann, M. T. Roos, V. D. Velden, F. Miedema, and B. G. Loss. 2011. Phenotypical and Functional Analysis of T cell. 2001. Aug; 36(4):214-20.

- Purnomo, M.,. 2001. *Isolasi Flavonoid dari Daun Beluntas (Pluchea indica Less) yang Mempunyai Aktivitas Antimikroba Terhadap Penyebab Bau Keringat Secara Bioautografi*. Surabaya. Universitas Airlangga.
- Quinn, P. J., B.K. Markey, M. E. Carter, W. J. Donnelly, and F. C. Leonard. 2002. *Veterinary Microbiology and Microbial Disease*. USA: Blackwell Science.
- Rifa'i, M. 2011. *Autoimun dan Bioregulator*. Malang: UB Press. Hal 29-164.
- Roberson, J. R., L. K. Fox, D. D. Hancock, J. M. Gay and T. E. Besser. 1994. Ecology of *Staphylococcus aureus* Isolated from Various Sites on Dairy Farms. *J. Dairy Sci.* 77 (11): 3354 - 3364.
- Rohde, H., S. Frankenberger, U. Zahringer, and D. Mack. 2010. Structure, Function and Contribution of Polysaccharide Intercellular Adhesion (PIA) to *Staphylococcus epidermidis*. Biofilm Formation and Pathogenesis of Biomaterial Associated Infection. Elsevier. *European Journal of Cell Biology*, vol 89, issue 1.
- Sikka, S.C., M. Rajasekaran, and W.J.G. Hellstrom. 1995. Role of oxidative stress and antioxidants in male infertility. *J. Androl.* 16(6): 464-468.
- Smith, A. C., dan M. A. Hussey. 2005. Gram Stain Protocol. <www.onlinemicrobioprotocol.com/gram_staining>. [Diakses pada 20 Desember 2017].
- Smith, B. J. dan S. Mangkoewidjojo. 1988. *Pemeliharaan, Pembiakan dan Penggunaan Hewan Percobaan di Daerah Tropis Indonesia*. Jakarta. University Press.
- Surati S. 2012. *Pengaruh Ekstrak Daun Salam (Syzygium Polyanthum) Terhadap Aktivitas Makrofag Pada Mencit BALB /c yang diinfeksi Salmonella Typhimurium*. [Tesis]. Universitas Diponegoro. Semarang.
- Susanti R dan R. Margareta .2003. Aktivitas Fagositosis Neutrofil Terhadap *Staphylococcus aureus* Isolat Sapi di Jawa Tengah dengan Teknik *Acridine Orange Fluorescence* Berkala. *Penelitian Hayati*: 61-66.
- Schalm, O. W.,E. J. Carron., and N. C Jain. 1971. *Bovine Mastitis*. Lea and Febriger. Philadelphia.
- Sutherland IW. 2001. Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework. Cambridge University. *Press Microb.* 147:3-9.
- Sudarwanto, M., A. W. Sanjaya, dan T. Purnawarman. 1992. *Residu Antibiotik dalam Susu*. Jakarta. Salemba Medika.
- Sudarwanto, M., H. Latif dan M. Noordin. 2006. The relationship of the somatic cell counting to sub-clinical mastitis and to improve milk Quality. 1st *International AAVS Scientific Conference*. Jakarta, July 12-13, 2006.

- Susetyarini, 2009. *Pengembangan Senyawa Aktif Daun Beluntas Untuk Kontrasepsi per Oral Sebagai Upaya Pengembangan Bahan Anti fertilitas. Laporan Penelitian*. Malang. Lemlit UMM.
- Stoodley, L. H., J. W. Costerton, P. Stoodley. 2004. Bacterial Biofilm: from the Natural Environment to Infectious Disease. *Nature Reviews. Microbiology. Vol 2, 95: 108*.
- Syamsuhidayat dan Hutapea, S. S. 1991. *Inventaris Tanaman Obat Indonesia*. Departemen Kesehatan Republik Indonesia. Jakarta. Hal. 470-471
- Todar, Kenneth. 2008. *The Good Bad and the Deadly*. Todar's Online Textbook of Bacteriology.
- Zecconi, A., L. Cesaris, E. Liandris, V. Dapra, R. Piccinini . 2006. Role of several *Staphylococcus aureus* virulence factors on the inflammatory response in bovine mammary gland. *Microb Pathol. 40:177-183*.

