

LAPORAN HASIL PENELITIAN

Judul : Pengaruh Pemberian Ekstrak Daun Sirih Hijau (*Piper betle* L.) Terhadap Rasio Neutrofil-Limfosit Pada Tikus Wistar (*Rattus norvegicus*) Jantan yang Terinfeksi *Staphylococcus aureus*

Nama : Bestaprielyn Josierade Situmorang

NPM : 20000021

Dosen Pembimbing I

(Dr. dr. Jenny Ria Sihombing, Sp.PK)

Dosen Pembimbing II

(dr. Hendra MKT)

Dosen Penguji

(dr. David Simangunsong, M.Kes)

Ketua PSK Sarjana Kedokteran

(dr. Ade Pryta R. Simaremare M.Biomed)

Dekan Fakultas Kedokteran

Universitas HKBP Nommensen

(Dr. dr. Leo Simanjuntak, Sp. OG)

BAB I**PENDAHULUAN**

Angka kejadian infeksi nosokomial di Indonesia masih sering terjadi, salah satu penyebabnya adalah bakteri *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*). Pada penelitian Amelia dkk terdapat 3 tempat tidur teridentifikasi adanya *S.aureus*.¹ Dan pada penelitian Leka Lutpiatina didapati 70% stetoskop di Rumah Sakit wilayah kota Banjarbaru tercemar *S.aureus*.² Data dari *World Health Organization* (WHO) menunjukkan bahwa prevalensi infeksi nosokomial bervariasi antara 5,7% hingga 19,1% di negara-negara berkembang dan prevalensi infeksi nosokomial 7,1% di Indonesia. Karena infeksi dapat berakibat fatal, maka harus segera diberikan

tatalaksana dengan memberikan obat antibakteri (antibiotik).³ *S. aureus* merupakan salah satu bakteri gram-positif yang merupakan flora normal pada kulit dan hidung manusia.⁴ *S. aureus* salah satu bakteri penyebab infeksi nosokomial dan mudah beradaptasi dengan antibiotik. Sehingga lebih mudah untuk mengalami resistensi atau MRSA (*Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus*).⁵ Bakteri ini dapat masuk ke dalam kulit, selaput lendir, dan organ dalam serta menyebabkan penyakit parah pada manusia dan hewan, termasuk septik, osteomielitis, endokarditis, infeksi saluran pernapasan, dan infeksi supuratif pada kulit.⁶

Infeksi bakteri *S. aureus* dapat menimbulkan respon inflamasi dalam tubuh, termasuk peningkatan jumlah leukosit, mulai dari infeksi kulit hingga infeksi yang lebih serius seperti infeksi sistemik.⁷ Menurut penelitian Tut Rayani dkk, terjadi peningkatan leukosit pada mencit yang diinfeksi *S. aureus*.⁸

Pada inflamasi sistemik, respon secara fisiologis yang akan terjadi adalah peningkatan neutrofil, dan penurunan limfosit.^{9,10} Karena adanya respon fisiologis tersebut, perbandingan atau rasio dari kadar neutrofil dan limfosit dapat dijadikan sebagai penanda sepsis.⁹

Rasio neutrofil limfosit atau Neutrophil-Lymphocyte Ratio (NLR) salah satu pemeriksaan sepsis yang sering digunakan sehari-hari, dan lebih baik sebagai penanda bakteremia jika dibandingkan dengan *C-reactive protein* (CRP), total leukosit, dan neutrofil.¹⁰ NLR juga dapat digunakan sebagai faktor untuk

menentukan prognosis pasien dalam berbagai situasi klinis.¹¹ Dan didapati nilai NLR lebih stabil dibanding rasio trombosit-limfosit, rasio limfosit-monosit, dan indeks peradangan imun sistemik pada orang dewasa sehat.¹²

Pada umumnya, terapi infeksi bakteri menggunakan antibiotik.¹³ Ditemukan beberapa bakteri yang mudah beradaptasi dengan antibiotik sehingga menyebabkan resistensi antibiotik.¹⁴ Resistensi antibiotik oleh *S. aureus* diteliti pertama kali pada tahun 1940-an.¹⁰ Adanya strain MRSA sebagai patogen yang memiliki nilai historis penting bagi kesehatan manusia dan hewan.¹⁵ MRSA adalah bakteri *S.aureus* yang patogen dan mengalami perubahan genetik pada kekebalan terhadap jenis antibiotik. Pada penelitian di RSUD Provinsi NTB, sebanyak 10,1% dari swab diafragma stetoskop dan 11,1% dari tensimeter terdeteksi sebagai MRSA.

Oleh karena adanya strain MRSA, maka dilakukan beberapa penelitian untuk pengobatan alternatif dari antibiotik, salah satunya adalah daun sirih hijau (*Piper betle L.*). Ekstrak daun sirih hijau (*Piper betle L.*) digunakan dalam penelitian ini telah diuji sebagai pengobatan alternatif yang lebih alami dan efektif dalam menghambat zona pertumbuhan bakteri *S. aureus*. Daun sirih hijau (*Piper betle L.*) mengandung senyawa aktif seperti saponin, tanin, flavonoid, fenol, dan hidroksikavikol yang memiliki sifat antibakteri, antiseptik, antifungi dan antiinflamasi.¹⁶

Efektivitas daun sirih hijau (*Piper betle L.*) sebagai antiinflamasi terbukti pada penelitian sebelumnya.¹⁷ Tumbuhan daun sirih hijau (*Piper betle L.*) sebagai salah satu sumber makanan dan obat-obatan, tanaman yang berguna bagi masyarakat. Secara empiris, tanaman mengandung sifat antibakteri, dan telah lama digunakan untuk tujuan pengobatan.¹⁸

Pada penelitian sebelumnya, pemberian ekstrak etanol daun sirih secara berulang dengan dosis 300, 500, dan 1.000 mg/KgBB selama enam bulan menunjukkan penurunan pada jumlah leukosit pada tikus dan mencit pada kelompok perlakuan dibandingkan dengan kelompok kontrol plasebo.¹⁹

Oleh karena *S.aureus* dapat menyebabkan septik, osteomielitis, endokarditis, infeksi saluran pernapasan, dan infeksi supuratif pada kulit.⁶ Penelitian ini menggunakan pemeriksaan NLR karena NLR adalah biomarker inflamasi dan

digunakan sebagai indikator inflamasi sistemik.²⁰ Dan berdasarkan penelitian Haris Setiawan dkk. terdapat peningkatan NLR pada tikus Wistar yang diberikan ekstrak etanol daun pepaya calina²¹, sehingga peneliti tertarik untuk mengetahui pengaruh pemberian ekstrak daun sirih hijau (*Piper betle L.*) terhadap NLR pada tikus Wistar yang terinfeksi *S.aureus*.

1.1. Rumusan Masalah

Bagaimana pengaruh dari pemberian daun sirih hijau (*Piper betle L.*) terhadap NLR pada tikus Wistar jantan yang terinfeksi *S. aureus*?

1.2. Hipotesis

Ho: Tidak terdapat pengaruh terhadap kadar NLR pada tikus Wistar jantan setelah pemberian daun sirih hijau (*Piper betle L.*)

Ha: Terdapat pengaruh terhadap kadar NLR pada tikus Wistar jantan setelah pemberian daun sirih hijau (*Piper betle L.*)

1.3. Tujuan Penelitian

1.3.1. Tujuan Umum

Untuk mengetahui NLR pada tikus Wistar jantan yang terinfeksi *S. aureus* setelah pemberian beberapa dosis daun sirih hijau (*Piper betle L.*).

1.3.2. Tujuan Khusus

1. Untuk mengetahui NLR tikus Wistar jantan yang terinfeksi *S. aureus* setelah pemberian daun sirih hijau (*Piper betle L.*) pada dosis 300 mg/KgBB.
2. Untuk mengetahui NLR tikus Wistar jantan yang terinfeksi *S. aureus* setelah pemberian daun sirih hijau (*Piper betle L.*) pada dosis 500 mg/KgBB.
3. Untuk mengetahui NLR tikus Wistar jantan yang terinfeksi *S. aureus* setelah pemberian daun sirih hijau (*Piper betle L.*) pada dosis 1000 mg/KgBB.
4. Untuk mengetahui NLR tikus Wistar jantan yang terinfeksi *S. aureus* setelah pemberian *cefadroxil* pada dosis 9 mg sebagai kontrol positif.

5. Untuk mengetahui NLR tikus Wistar jantan yang terinfeksi *S. aureus* setelah pemberian *aquades* sebagai kontrol negatif.

1.4. Manfaat Penelitian

1.4.1. Bagi Peneliti

Untuk menerapkan dan mengembangkan ilmu kedokteran yang didapat selama belajar di Fakultas Kedokteran, serta menambah pengetahuan bagi peneliti tentang pengobatan dengan bahan alami sebagai antibakteri.

1.4.2. Bagi Institusi

Untuk menambah wawasan peneliti lain dan sebagai referensi untuk penelitian selanjutnya yang berhubungan dengan ekstrak daun sirih sebagai antibakteri.

1.4.3. Bagi Masyarakat

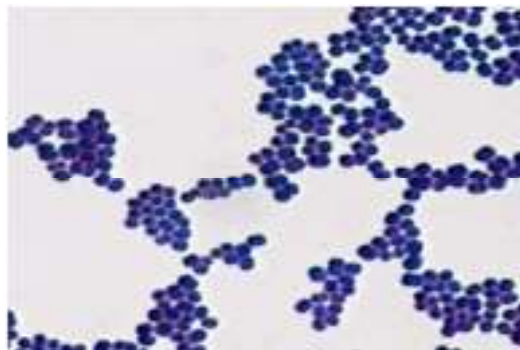
Menjadi sumber informasi bagi masyarakat sebagai salah satu pengobatan tambahan dari bahan alami untuk penyakit infeksi bakteri *S. aureus*.

BAB II TINJAUAN PUSTAKA

2.1. *Staphylococcus aureus*

2.1.1. Taksonomi *Staphylococcus aureus*

<i>Kingdom</i>	: <i>Eubacteria</i>
<i>Phylum</i>	: <i>Firmicutes</i>
<i>Kelas</i>	: <i>Bacilli</i>
<i>Ordo</i>	: <i>Bacillales</i>
<i>Famili</i>	: <i>Staphylococcaceae</i>
<i>Genus</i>	: <i>Staphylococcus</i>
<i>Spesies</i>	: <i>Staphylococcus aureus</i> ²²



Gambar 2. 1 Bakteri *Staphylococcus aureus*²³

2.1.2. Morfologi *Staphylococcus aureus*

S. aureus adalah bakteri gram positif, yang berbentuk bulat atau dikenal sebagai kokus, berkelompok seperti anggur, yang disebut sebagai kelompok *staphylococcal (grape-like clusters)*. *S. aureus* memiliki ukuran yang bervariasi, dengan diameter sekitar 0,7 hingga 1,2 mikrometer. *S. aureus* memiliki dinding sel yang terdiri dari peptidoglikan, yang memberikan kekuatan struktural dan membantu dalam mempertahankan bentuk sel. *S. aureus* dapat tumbuh secara anaerobik dan aerobik, pada suhu 35°C -40°C.²⁴

2.1.3. Enzim dan Toksin

S. aureus menghasilkan beberapa jenis toksin hemolisin, seperti alfa-hemolisin, beta-hemolisin, dan delta-hemolisin. Toksin hemolisin dapat merusak membran sel darah merah dan jaringan inang. Toksin eksfoliatin adalah faktor

virulensi yang menyebabkan pelepasan lapisan atas kulit atau mukosa. Hal ini dapat menyebabkan kondisi seperti *staphylococcal scalded skin syndrome* (SSSS) pada anak-anak. Beberapa strain *S. aureus* menghasilkan *Toxic Shock Syndrome* (TSS) yang dapat menyebabkan TSS, suatu kondisi serius yang ditandai dengan demam tinggi, ruam, penurunan tekanan darah, dan gangguan organ. *S. aureus* menghasilkan enzim koagulase, yang mengubah fibrinogen menjadi fibrin, membentuk bekuan darah.^{22,24}

2.1.4. Patogenesis *Staphylococcus aureus*

Bakteri *S. aureus* memproduksi koagulase, yang mengkatalisis fibrinogen menjadi fibrin dan membantu pembentukan barisan pelindung. Selain itu, bakteri ini memiliki protein matriks pemacu adhesi (termasuk fibronektin dan kolagen) dan reseptor pada permukaan sel inang. Enzim link ekstraseluler yang dibuat oleh bakteri ini, termasuk lipase, mendegradasi jaringan inang dan membantu invasi. Sindrom syok toksik disebabkan oleh eksotoksin poten dari beberapa strain bakteri. Kemudian terdapat enterotoksin, yang menyebabkan diare.²⁵

2.1.5. Gambaran Klinis Infeksi *Staphylococcus aureus*

Infeksi *S. aureus* merupakan sindrom infeksi yang luas. Infeksi kulit terjadi pada kondisi hangat yang lembap atau saat kulit terbuka akibat penyakit seperti eksim, luka pembedahan, atau akibat alat intravena. Impetigo muncul pada kulit yang sehat (infeksi ditransmisi dari orang lain). Pneumonia yang disebabkan *S. aureus* jarang terjadi, namun dapat terjadi setelah influenza, kemudian berkembang dengan cepat membentuk kavitas dan bermortalitas tinggi. Endokarditis karena *S. aureus* juga berkembang dengan cepat dan bersifat destruktif dan dapat terjadi setelah penyalahgunaan obat intravena. *Staphylococcus aureus* juga merupakan agen yang menyebabkan osteomyelitis dan artritis.²⁶

2.1.6. Daya Tahan *Staphylococcus aureus*

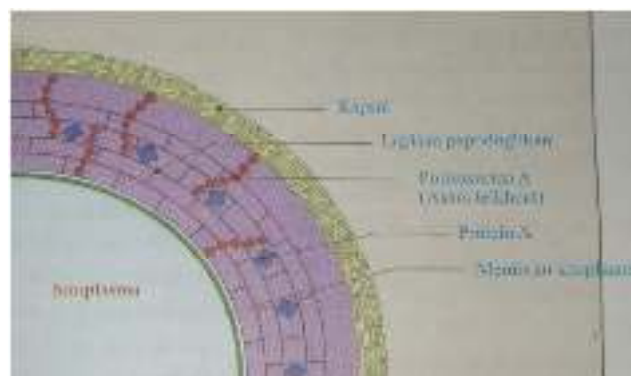
Di antara semua mikroorganisme yang tidak menghasilkan spora, *Staphylococcus aureus* dianggap sebagai jenis mikroorganisme yang memiliki daya tahan paling tinggi. Untuk menjaga kelangsungan hidup *Staphylococcus aureus* selama berbulan-bulan, disarankan untuk menyimpannya dalam kondisi

dingin seperti dalam lemari es dan menjaganya dalam keadaan kering, baik di atas benang, kertas, atau kain, sehingga mikroorganisme *Staphylococcus aureus* dapat tetap bertahan hidup selama periode waktu yang berkisar antara 6 hingga 14 minggu. Dalam berbagai zat kimia daya tahannya ialah Tinc.jodii 2% selama 1 menit, H₂O₂3% selama 3 menit, HgCl₂1% selama 10 menit, Fenol 2% selama 15 menit, Alkohol 50-70% selama 1 jam.

S. aureus memiliki ketahanan selama 5 menit, namun akan mengalami kematian dalam jangka waktu 10 menit jika berada dalam larutan fenol dengan konsentrasi 1/90. Oleh Food and Drug Administration (FDA) Amerika Serikat, *Staphylococcus aureus* digunakan sebagai mikroorganisme uji standar dalam evaluasi antiseptik lainnya dalam prosedur pengujian yang disebut sebagai tes Koefisien Fenol.²⁴

2.1.7. Struktur Antigen

S.aureus mengandung zat-zat antigenik seperti polisakarida dan protein dalam komposisinya. Polisakarida yang ada pada varian yang virulen disebut polisakarida A, sedangkan pada jenis yang tidak berbahaya disebut polisakarida B. Polisakarida A adalah bagian dari dinding sel yang dapat diekstraksi dengan menggunakan asam triklorasetat. Antigen ini terdiri dari kompleks peptidoglikan asam teikhoat dan memiliki kemampuan untuk menghambat proses fagositosis. Protein antigen A terdapat pada lapisan luar dari antigen polisakarida, dan keduanya bersama-sama membentuk struktur dinding sel pada mikroorganisme tersebut.²⁴



Gambar 2. 2 Struktur Antigen *Staphylococcus aureus*²⁷

2.2. Daun Sirih Hijau (*Piper betle L.*)

2.2.1. Taksonomi Daun Sirih Hijau

<i>Kingdom</i>	: <i>Plantae</i>
<i>Divisi</i>	: <i>Magnoliophyta</i>
<i>Class</i>	: <i>Magnoliopsida</i>
<i>Ordo</i>	: <i>Piperales</i>
<i>Family</i>	: <i>Piperaceae</i>
<i>Genus</i>	: <i>Piper</i>
<i>Spesies</i>	: <i>Piper betle</i> ²⁸



Gambar 2. 3 Daun Sirih Hijau (*Piper betle L.*)²⁹

2.2.2. Morfologi Daun Sirih Hijau

Tumbuhan daun sirih hijau merupakan tumbuhan yang merambat hingga dapat mencapai tinggi 15 meter. Batang berwarna coklat kehijauan dan beruas. Daun berbentuk bulat telur hingga lonjong, dan merupakan daun tunggal, memiliki tepi yang runcing, ujung daun membulat, pangkal daun menyirip, dan tekstur daun halus dan licin. Bunga majemuk, bentuk bulir, dan berwarna putih.³⁰

2.2.3. Manfaat Daun Sirih

Daun sirih hijau memiliki manfaat sebagai antibiotik (antibakteri), antiseptik, antiinflamasi, antioksidan, obat keputihan, karminatif (meredakan kolik), obat asma, obat tenggorokan, penyembuhan luka, afrodisiak (meningkatkan libido), dan laksatif (pencahar).⁷

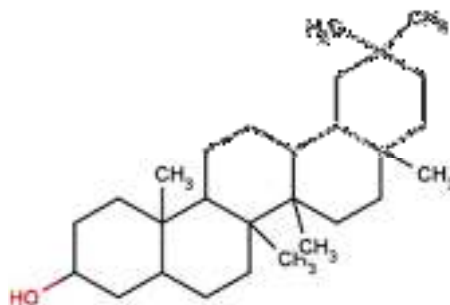
Kandungan senyawa aktif seperti eugenol, kavikol, dan lainnya memberikan daun sirih hijau sifat antiseptik dan antimikroba yang kuat, sehingga efektif dalam menghambat pertumbuhan mikroorganisme patogen. Selain itu,

senyawa-senyawa ini juga memiliki sifat antiinflamasi.²⁸ Penelitian telah menunjukkan bahwa daun sirih hijau dapat berperan dalam pengelolaan gula darah, menjadikannya berpotensi sebagai tambahan dalam pengobatan diabetes.³⁰ Selain itu, beberapa penelitian menunjukkan bahwa senyawa dalam daun sirih memiliki potensi sebagai antioksidan; pencegahan pertumbuhan sel kanker, pencegahan penuaan dini, dan penyembuhan luka.³¹ Selain manfaat medis, daun sirih juga digunakan dalam pengobatan tradisional untuk masalah kulit dan kesehatan reproduksi.³⁰

2.2.4. Kandungan Kimia dan Efek Farmakologis

Daun sirih hijau mengandung minyak atsiri yang berguna untuk antiseptik, dan terdapat sebesar 0,8-1,8%. Terdapat zat bioaktif (seperti saponin, tanin, flavonoid, fenol, dan hydroxychavicol) yang berperan sebagai antiinflamasi, mampu membantu dalam proses penyembuhan luka.^{28,32}

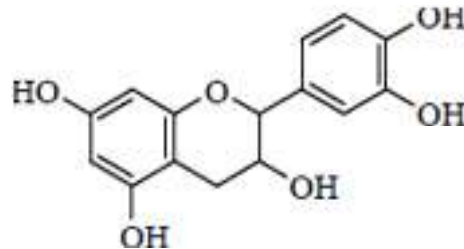
a. Saponin



Gambar 2. 4 Struktur Senyawa Saponin³³

Saponin adalah senyawa glikosida kompleks yang mempunyai bobot molekul yang besar. Saponin dikelompokkan menjadi 3 kelompok besar berdasarkan struktur kimia, antara lain steroid, alkaloid, dan triterpenoid. Senyawa saponin dapat bekerja sebagai antimikroba. Titik leburnya ≥ 200 °C atau 392 °F. Senyawa ini akan merusak membran sitoplasma dan membunuh sel. Sedangkan aktivitas farmakologi saponin yang telah dilaporkan antara lain sebagai antiinflamasi, antibiotik, antifungi, antivirus, hepatoprotektor serta antiulcer.³³

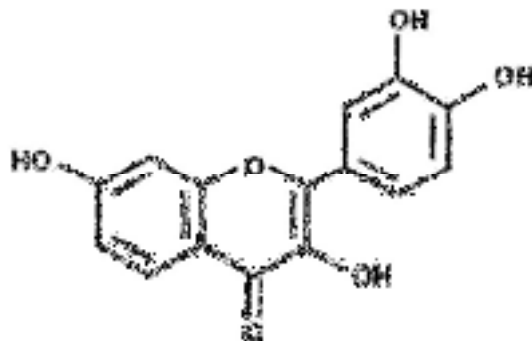
b. Tanin



Gambar 2. 5 Struktur Senyawa Tanin²⁷

Tanin adalah suatu senyawa polifenol yang memiliki berat molekul besar yang terdiri dari gugus hidroksil dan karboksil. Senyawa tanin bersifat antibakteri yang dapat menghambat pembentukan dinding peptidoglikanya sehingga pembentukan dinding bakteri tidak akan sempurna. Titik lebur tanin ≥ 100 °C atau 212 °F. Tanin juga diketahui mempunyai aktifitas antiinflamasi, astringen, antidiare, diuretik dan antiseptik.^{34,35}

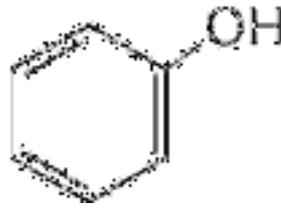
c. Flavonoid



Gambar 2. 6 Struktur Senyawa Flavonoid³⁶

Flavonoid adalah kelas yang luas dari bahan kimia polifenol yang ditemukan dalam tanaman yang memiliki karakteristik pereduksi yang kuat. Dapat menghentikan proses oksidasi yang melibatkan enzim dan non-enzim. Tiga mekanisme kerja Flavonoid adalah menghambat asam nukleat, mencegah metabolisme energi, dan merusak fungsi membran sel yang digunakan untuk membunuh bakteri. Karena ada perlekatan terhadap DNA bakteri, flavonoid berpotensi merusak dinding sel, lisosom, dan permeabilitas mikrosom. Titik leburnya ≤ 200 °C . Ekstrak daun sirih hijau (*Piper betle* L.) mengandung 1,077% flavonoid dalam 40 gram, menurut Kurniawan et al.³⁶

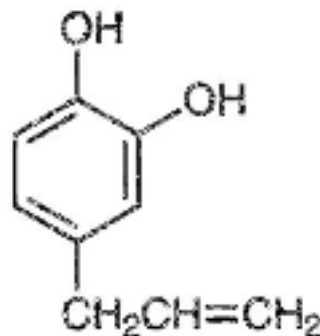
d. **Fenol**



Gambar 2. 7 Struktur Senyawa Fenol²⁹

Fenol merupakan bahan aktif dalam ekstrak daun sirih hijau (*Piper betle* L.) yang memiliki efek antibakteri. Titik lebur senyawa ini 40-45°C atau 104-113°F. Fenol bekerja sebagai agen antibakteri dengan cara bertindak sebagai toksin dalam protoplasma, menghancurkan dan menembus dinding sel dan mengendapkan protein dari sel bakteri. Ikatan hidrogen yang terbentuk antara fenol dan protein mengakibatkan struktur protein menjadi rusak. Ikatan hidrogen tersebut akan mempengaruhi permeabilitas dinding sel dan membran sitoplasma sebab keduanya tersusun atas protein sehingga menyebabkan ketidakseimbangan makromolekul dan ion interseluler kemudian dapat melisis sel.^{33,37}

e. **Hidroksikavikol**



Gambar 2. 8 Struktur Senyawa Hidroksikavikol³⁸

Daun sirih mengandung sejumlah besar hidroksikavikol, yang dikenal memiliki berbagai manfaat kesehatan. Titik leburnya 60-70°C atau 140-158°F. Hidroksikavikol terbukti memiliki sejumlah sifat biologis yang menguntungkan, termasuk tindakan antibakteri dan antikanker terhadap berbagai jenis kanker. Pada sel yang diobati dengan hidroksikavikol, gen yang merespon kerusakan DNA dan mengontrol invasi diregulasi.³⁸

2.3. Rasio Neutrofil-Limfosit (NLR)



Gambar 2. 9 Morfologi Neutrofil dan Limfosit³⁹

Neutrofil adalah sel leukosit polimorfonuklear (granulosit) yang paling banyak ditemukan dalam darah. Sel ini berperan dalam imunitas terhadap pathogen. Limfosit adalah salah satu jenis dari sel leukosit yang berperan dalam respon imun tubuh. 20-40% dari leukosit adalah sel limfosit.⁴⁰

Perbandingan jumlah neutrofil dan limfosit dapat mengubah proporsi atau persentase keduanya yang dikenal istilah rasio neutrofil terhadap limfosit (NLR).⁴¹ NLR adalah biomarker inflamasi sistemik akut. Neutrofil melepaskan berbagai sitokin inflamasi untuk mengaktifkan sel inflamasi dan respon imun, kemudian menyebabkan stress oksidatif dan cedera endotel.⁴² Limfosit berperan sebagai sistem imun yang spesifik. *Apoptosis* pada limfosit adalah proses yang mendasari pengurangan limfosit. Dengan melepaskan interferon gamma dari sel *natural killer* dan steroid endogen, respon stres terhadap invasi bakteri menyebabkan *apoptosis* limfosit.⁴³

Pemeriksaan NLR ini digunakan untuk membantu menegakkan diagnosa suatu penyakit dan mendeteksi terjadinya inflamasi. Pada pasien sepsis didapatkan terjadi peningkatan NLR.⁴⁴ Pada pasien Diabetes Melitus (DM) tipe 2 juga terjadi

peningkatan NLR, karena berhubungan dengan inflamasi kronik, keadaan dimana pasien akan mengalami penyakit arteri perifer ekstremitas bawah.⁴⁵

2.4. Tikus Putih Galur Wistar

Tikus memiliki ekor yang panjang, telinga yang besar, pendek, tebal, dan kepala yang mengarah ke depan dengan rambut panjang dan halus di kedua bibirnya. Tikus tidak memiliki rambut panjang di ekornya. Tikus memiliki kaki belakang yang lebih besar daripada kaki depan. Bulunya memiliki berbagai macam warna, dari coklat kehitaman hingga putih. Panjang tubuh tikus tergantung pada spesiesnya, antara lain tikus putih, tikus *pithi*, tikus rumah, tikus sawah, tikus werok, dan lain-lain. Pada bagian dada hingga perut tikus betina terdapat enam pasang puting susu. Tikus memiliki skrotum yang menonjol.^{46,47}

2.5. Metode Ekstraksi

Ekstraksi adalah teknik yang digunakan untuk mendapatkan komposisi senyawa kimia dari tanaman atau hewan dengan memanfaatkan pelarut yang tepat dalam standar prosedur ekstraksi. Proses ekstraksi berakhir pada konsentrasi bahan kimia dalam pelarut dan simplisia berada dalam kesetimbangan. Setelah ekstraksi selesai, penyaringan digunakan untuk memisahkan ampas padat dan pelarut.^{48,49}

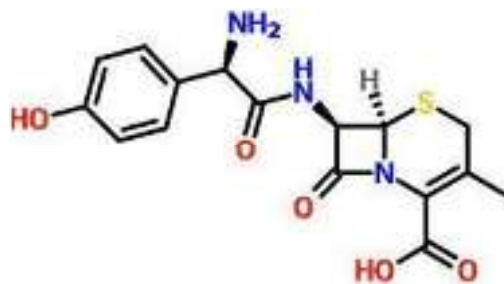
Metode ekstraksi yang paling sederhana dan paling banyak digunakan adalah maserasi. Serbuk simplisia dimaserasi dengan cara direndam dalam cairan pelarut. Cairan tersebut akan masuk ke dinding sel hingga ke dalam ruang sel yang mengandung bahan kimia aktif. Karena adanya perbedaan konsentrasi antara larutan zat aktif di dalam sel dan di luar sel, maka zat aktif akan larut dan terdorong keluar sel. Proses ini berlanjut hingga konsentrasi cairan di dalam dan di luar sel seimbang. Setelah proses berakhir, filter digunakan untuk memisahkan cairan penyuling dari sampel.⁵⁰

2.6. *Cefadroxil*



Gambar 2. 10 *Cefadroxil* kapsul 500 mg⁴⁰

Produsen	: Lapi
Isi	: <i>cefadroxil monohydrate</i>
Kelas MIMS	: <i>Sefalosporin</i>
Bentuk	: Kapsul
Warna	: Biru, kuning
Ukuran	: 2,2 cm ⁵¹

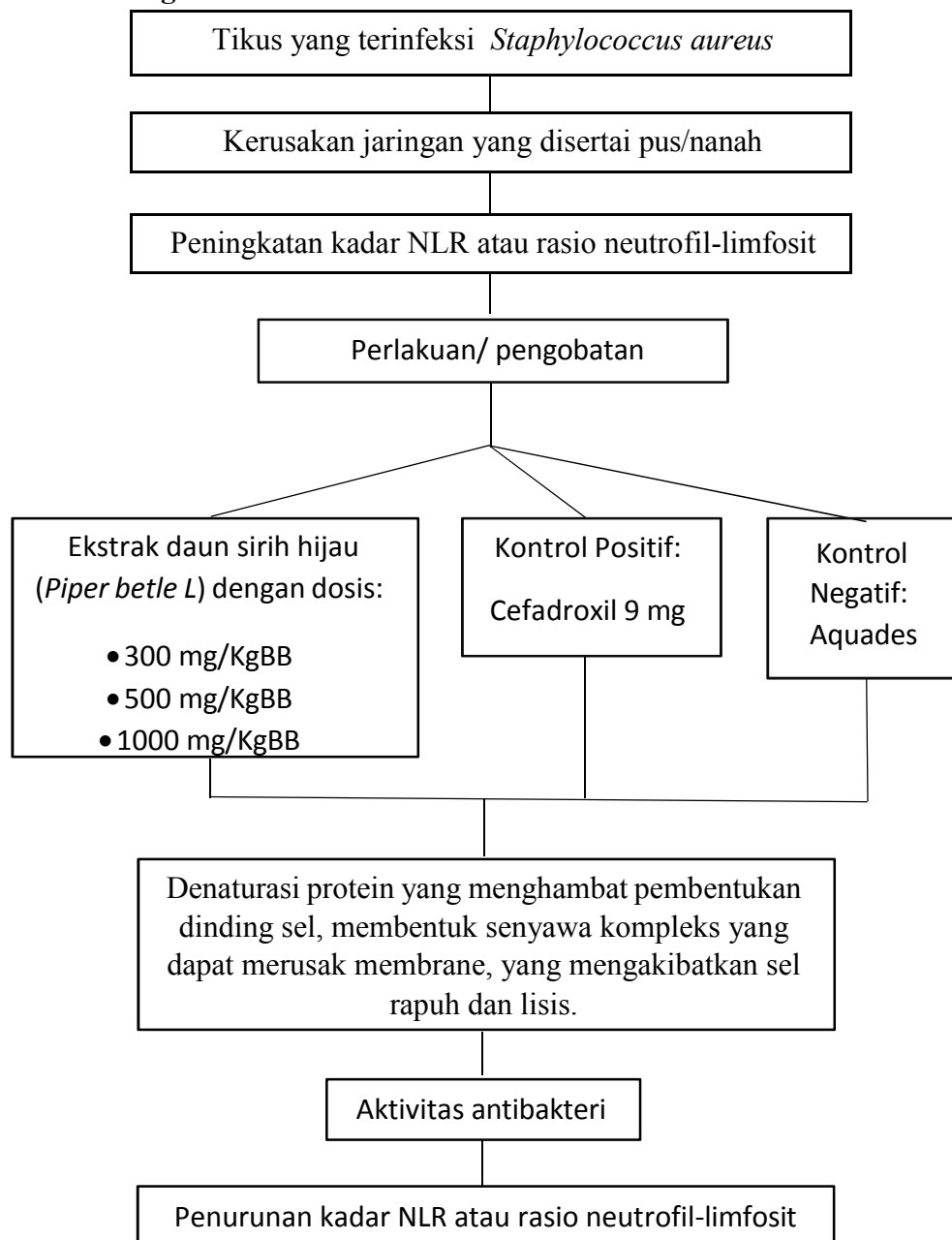


Gambar 2. 11 Struktur Senyawa *Cefadroxil*⁸⁹

Cefadroxil adalah antibiotik dari generasi pertama sefalosporin. Antibiotik ini bekerja dengan mencegah pertumbuhan bakteri. *Cefadroxil* juga berfungsi dengan mencegah sintesis protein yang diperlukan untuk dinding sel bakteri. Obat ini akan menghancurkan ikatan yang menahan dinding sel bakteri, membunuh mikroorganisme. Infeksi virus tidak dapat diobati dengan *cefadroxil*; obat ini hanya mengatasi infeksi bakteri. *Cefadroxil* adalah antibiotik spektrum luas yang membunuh berbagai bakteri, baik gram positif maupun gram negatif, sesuai dengan cara kerjanya.^{52,53}

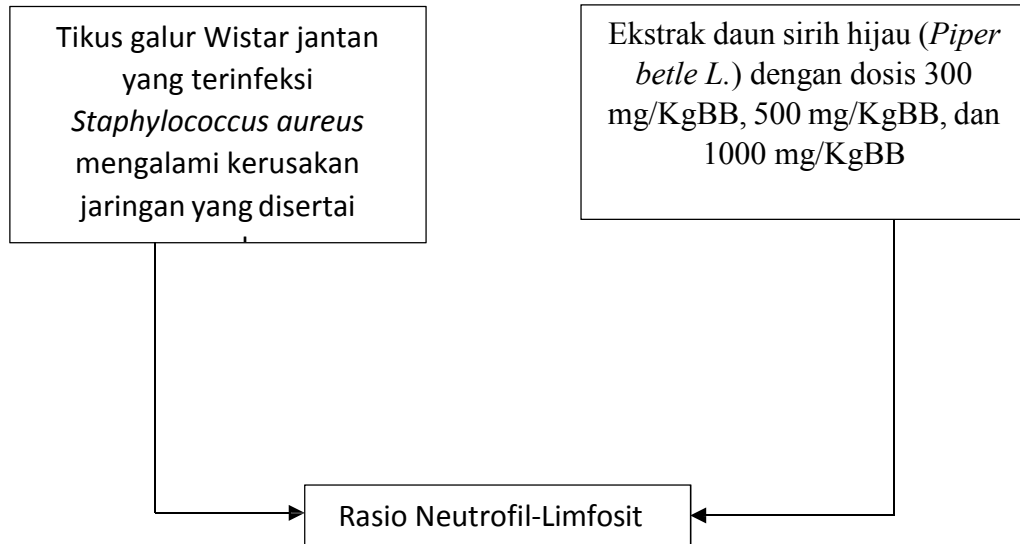
Adapun cara kerja dari *cefadroxil* ini dengan menggunakan protein pengikat penisilin (PBP) pada membran bagian dalam dinding sel bakteri diikat oleh *cefadroxil* dan menjadi inaktif. PBP adalah enzim yang menyelesaikan proses perakitan dinding sel bakteri dan memodifikasi dinding sel seiring pertumbuhan dan pembelahan organisme. Ikatan silang rantai peptidoglikan, yang penting untuk kekuatan dan kekakuan dinding sel bakteri, terganggu ketika PBP dinonaktifkan. Akibatnya, dinding sel bakteri menjadi lemah dan terjadi lisis sel.⁵⁴

2.7. Kerangka Teori



Gambar 2. 12 Kerangka Teori

2.8. Kerangka Konsep



Gambar 2. 13 Kerangka Konsep

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

3.1. Desain Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental dengan metode rancangan *Pre test* dan *Post test with Control Group Design*.

Sampel	Pretest	Perlakuan	Posttest
R	O ₁	X	O ₂
R	O ₃	-	O ₄

Tabel 3. 1 Tabel *Pre test* dan *Post test Control Group Design*⁵⁵

Keterangan:

R = Pengambilan Sampel secara acak

X = Perlakuan

O₁ = *Pre test* kelompok perlakuan

O₂ = *Post test* kelompok perlakuan

O₃ = *Pre test* kelompok kontrol

O₄ = *Post test* kelompok kontrol

3.2. Tempat dan Waktu Penelitian

3.2.1. Tempat Penelitian

Pembuatan ekstrak daun sirih hijau (*Piper betle L.*) dan pengambilan sampel darah hewan coba dilakukan di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Sumatra Utara. Pemeriksaan sampel darah hewan coba dilakukan di Laboratorium Kesehatan Daerah Provinsi Sumatra Utara.

3.2.2. Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan September sampai Desember 2023.

3.3. Sampel dan Penentuan Jumlah Sampel

3.3.1. Sampel

Sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah tikus Wistar yang memenuhi kriteria inklusi.

3.3.2. Penentuan Jumlah Sampel

Penentuan besar sampel dilakukan dengan penggunaan rumus Federer⁴⁹.

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

Keterangan:

t = jumlah perlakuan yang akan diberikan

n = jumlah sampel per kelompok yang hendak dicari

Penelitian ini menggunakan 5 kelompok (Kelompok kontrol positif, kelompok kontrol negatif, kelompok I, kelompok II, dan kelompok III), maka jumlah sampel yang diperoleh dari perhitungan adalah sebagai berikut:

Rumus:

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

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

$$4(n-1) \geq 15$$

$$4n - 4 \geq 15$$

$$4n \geq 15+4$$

$$4n \geq 19$$

$$n \geq 19:4$$

$$n \geq 4,75$$

$$n \geq 5$$

Sampel koreksi untuk mengantisipasi drop out/mati 10%, maka dipakai:

Rumus:

$$n' = n/(1-f)$$

Keterangan :

- n' = sampel koreksi
- n = jumlah sampel minimal
- f = perkiraan proporsi drop out 10% (0,1)

$$\text{Maka: } n' = 25 / (1-0,1) = 27,7 \rightarrow 28$$

Jumlah tikus cadangan, dengan rumus:

$$\text{Jumlah kelompok perlakuan } x$$

$$= 5 \times (28-25)$$

$$= 15 \text{ ekor tikus.}$$

Keseluruhan 25 ekor tikus yang digunakan dibagi menjadi 5 kelompok, dengan cadangan yang dibutuhkan sebanyak 15 ekor tikus putih wistar jantan (*Rattus norvegicus*). Jadi, jumlah sampel secara keseluruhan yang dibutuhkan sebanyak 40 ekor tikus putih wistar jantan (*Rattus norvegicus*).

3.4. Kriteria Inklusi & Eksklusi

3.4.1. Kriteria Inklusi

1. Tikus sehat dan bergerak aktif
2. Usia tikus 2-3 bulan
3. Berat badan tikus Wistar jantan 150-200 gram

3.4.2. Kriteria Eksklusi

1. Tikus mati pada saat adaptasi dan penelitian
2. Tikus pernah digunakan sebagai hewan coba pada penelitian sebelumnya.

3.5. Instrumen Penelitian

Alat dan bahan yang digunakan dalam penelitian sebagai berikut:

3.5.1. Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah kandang hewan, tampah, blender, timbangan digital, masker, sarung tangan, kertas label, mikropipet, cawan petri, ose bulat, ose lurus, labu ukur, gelas ukur, autoklaf, bunsen, tabung reaksi, rak tabung reaksi, spuit, mikroskop, tabung minum tikus, gunting, tempat makan tikus, scalpel, pisau cukur, saringan, tabung EDTA, tabung kapiler (*Marienfeld Capillary*), dan timbangan neraca.

3.5.2. Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini sebagai berikut: bakteri *S. aureus*, tikus Wistar jantan (*Rattus norvegicus*), pakan dan minum, ekstrak daun sirih hijau (*Piper betle* L), kontrol (+) dengan antibiotik *Cefadroxil* 9 mg, kontrol (-) dengan *aquadest*, kertas saring, tissue, swab, tabung reaksi rotary evaporator, *aquabidest* dan media MHA (*Mueller Hinton Agar*).

3.6. Prosedur Kerja Penelitian

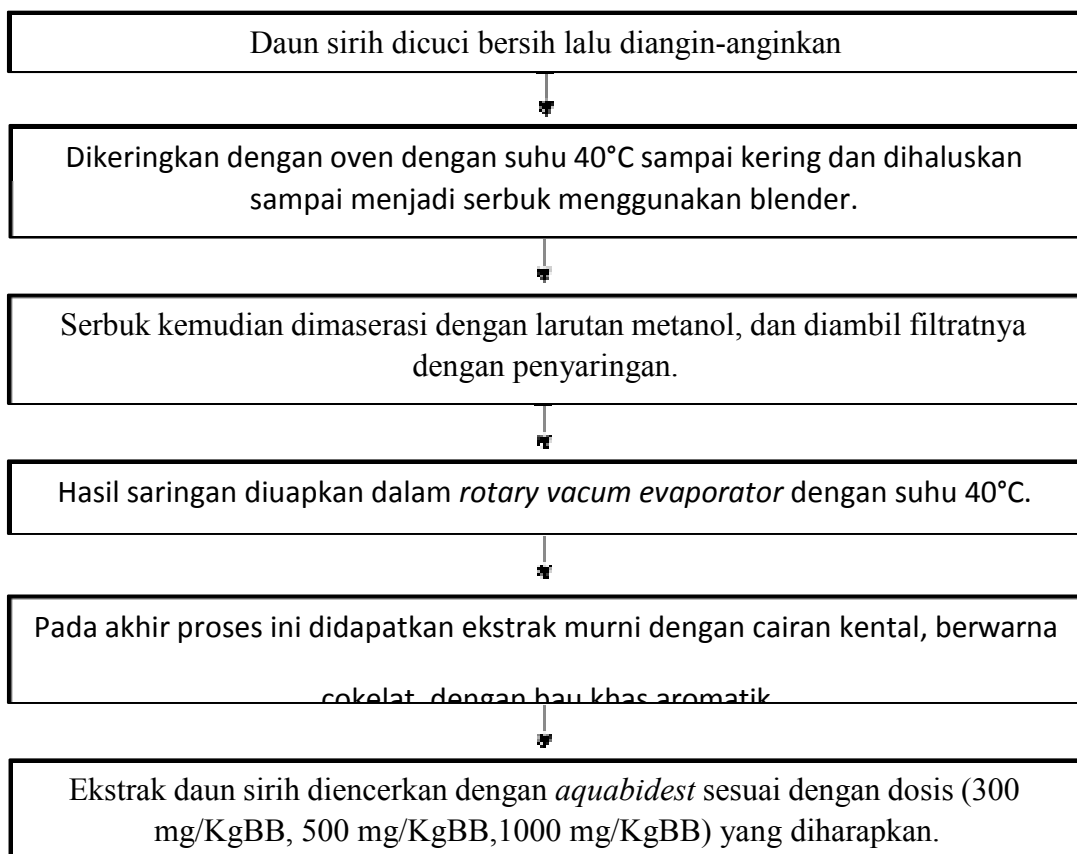
3.6.1. Persiapan dan Etik Penelitian

Peneliti meminta izin dengan menggunakan ethical clearance dan peneliti meminta izin permohonan pelaksanaan penelitian yang diajukan pada institusi Fakultas Kedokteran Universitas HKBP Nommensen.

3.6.2. Persiapan Hewan Uji

Hewan uji diadaptasi dalam kandang hewan terlebih dahulu selama 7 hari dan diberi pakan standar serupa. Hewan uji yang dipakai sebanyak 25 ekor tikus dan tikus dikelompokkan menjadi 5 kelompok masing-masing kelompok terdiri dari 5 ekor; 3 kelompok perlakuan, 1 kelompok kontrol positif dan 1 kelompok kontrol negatif. Setiap kelompok dipisahkan dalam kandang yang berbeda.

3.6.3. Diagram Pembuatan Ekstrak Daun Sirih Hijau⁵⁶



Gambar 3. 1 Pembuatan ekstrak daun sirih hijau

3.6.4. Perhitungan Dosis Ekstrak Daun Sirih²⁷

1. Dosis 300 mg/kgBB = $300 \text{ mg} \times 186 \text{ g (BB rata-rata tikus)} / 1000 \text{ g}$
 $= 55,8 \text{ mg/ekor} = 0,0558 \text{ g/ekor} \times 5$
 $= 0,279 \text{ g/hari} + 18 \text{ ml aquabidest.}$
2. Dosis 500 mg/kgBB = $500 \text{ mg} \times 186 \text{ g (BB rata-rata tikus)} / 1000 \text{ g}$
 $= 93 \text{ mg/ekor} = 0,093 \text{ g/ekor} \times 5$
 $= 0,465 \text{ g/hari} + 18 \text{ ml aquabidest.}$
3. Dosis 1000 mg/kgBB = $1000 \text{ mg} \times 186 \text{ g (BB rata-rata tikus)} / 1000 \text{ g}$
 $= 186 \text{ mg/ekor} = 0,186 \text{ g/ekor} \times 5$
 $= 0,93 \text{ g/hari} + 18 \text{ ml aquabidest.}$

3.6.5. Pembuatan Luka Pada Tikus⁵⁷

1. Bulu pada bagian punggung tikus dicukur dengan diameter $\pm 3 \text{ cm}$.
2. Bagian punggung dibersihkan menggunakan alkohol 70%.
3. Tikus dianestesi menggunakan lidocaine 0,1 mL melalui jalur intra muskular.
4. Dilakukan penyayatan dengan panjang 2 cm dan kedalaman sampai dermis menggunakan scalpel steril No.11.
5. Daerah luka dibersihkan dengan menggunakan NaCl 0,9%.
6. Tiap luka kemudian ditetesi dengan suspensi *S.aureus* dengan menggunakan mikropipet bakteri sebanyak 0,1 mL.

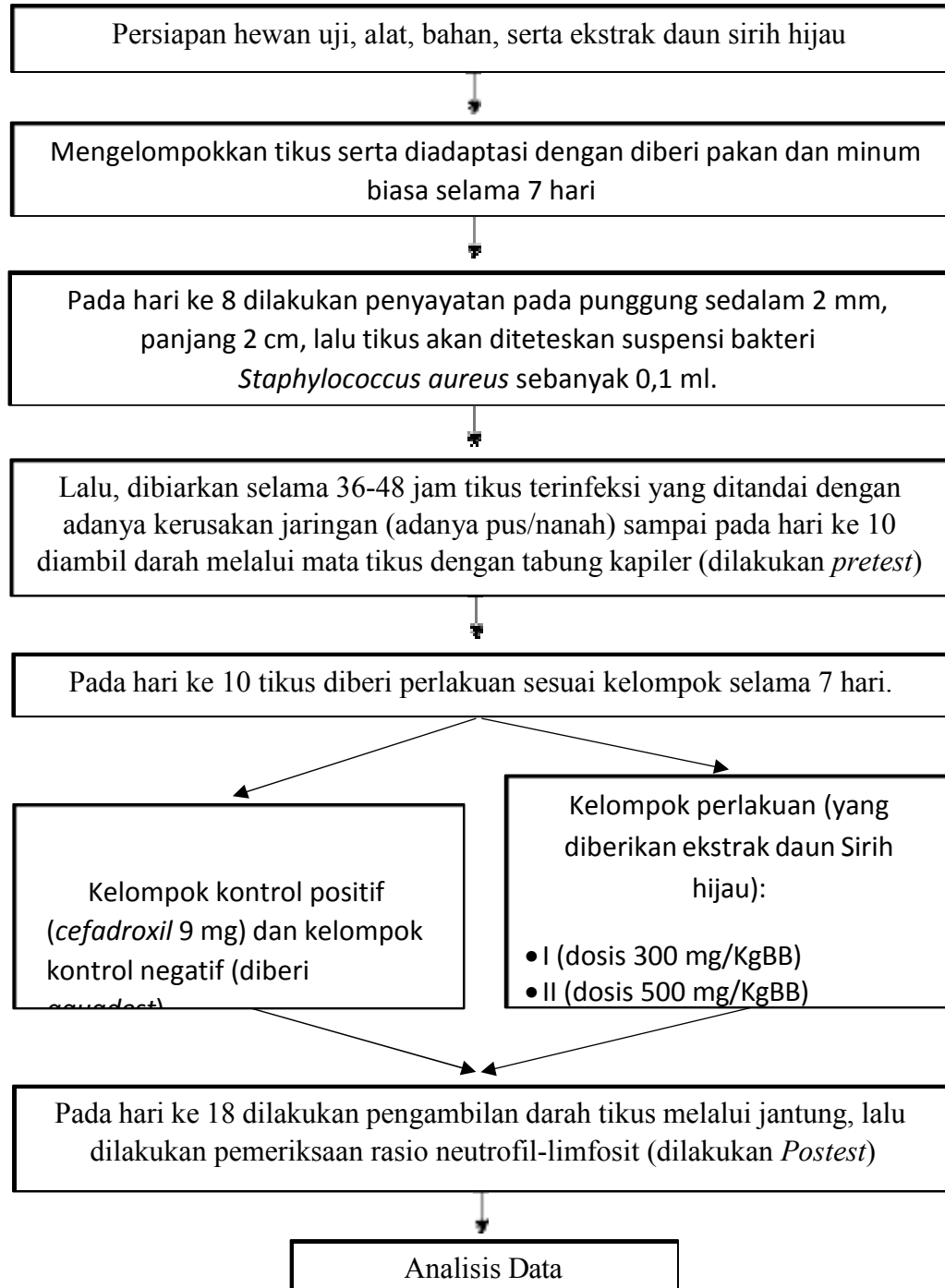
3.6.6. Pelaksanaan Percobaan

1. Sebelum dilakukan percobaan, 40 ekor tikus diadaptasi di dalam kandang selama 7 hari.
2. Tikus *Rattus norvegicus* sejumlah 25 ekor dibagi menjadi 5 kelompok yang masing-masing kelompok terdiri dari 5 ekor. Kelompok kontrol positif merupakan kelompok yang diberikan antibiotik *cefadroxil* dengan dosis 9 mg. Kelompok I merupakan kelompok yang diberi ekstrak daun sirih hijau dengan dosis 300 mg/KgBB. Kelompok II merupakan kelompok yang diberi ekstrak daun sirih hijau dengan 500

mg/KgBB. Kelompok III merupakan kelompok yang diberi ekstrak daun sirih hijau dengan 1000 mg/KgBB. Kelompok kontrol negatif merupakan kelompok yang hanya diberi *aquadest*.

3. Pada hari ke-8, semua kelompok tikus diinfeksi dengan cara ditetesi suspensi bakteri *S. aureus* (0,1 mL) pada luka sayatan (panjang 2 cm)
4. Dibiarkan selama 2 hari agar mengalami infeksi yang ditandai dengan adanya pus (nanah) dan peningkatan NLR yang dinilai dari pengambilan darah tikus melalui mata tikus dengan menggunakan tabung kapiler.
5. Setelah 2 hari diinfeksi, pada hari ke-10 sampai hari ke-17 tikus diberi perlakuan sesuai kelompok selama 7 hari.
6. Setelah 7 hari diberikan perlakuan sesuai kelompok (pada hari ke-18), dilakukan pengambilan darah tikus melalui jantung dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi.
7. Kemudian dilakukan pemeriksaan jumlah NLR tikus di Laboratorium Kesehatan Daerah Provinsi Sumatra Utara.

3.6.7. Diagram Alur Penelitian



Gambar 3. 2 Diagram alur penelitian

3.6.8. Perhitungan Dosis Antibiotik *Cefadroxil*

	Manusia 70kg	Manusia 50kg	Manusia 40kg	Manusia 30kg	Manusia 20kg	Manusia 10kg	Tikus 200g	Tikus 70kg
500mg	1.0	0.8	0.6	0.4	0.2	0.1	0.02	0.07
250mg	0.5	0.4	0.3	0.2	0.1	0.05	0.01	0.035
125mg	0.25	0.2	0.15	0.1	0.05	0.025	0.005	0.0175
62.5mg	0.125	0.1	0.075	0.05	0.025	0.0125	0.0025	0.00875
31.25mg	0.0625	0.05	0.0375	0.025	0.0125	0.00625	0.00125	0.004375
15.625mg	0.03125	0.025	0.01875	0.0125	0.00625	0.003125	0.000625	0.0021875
7.8125mg	0.015625	0.0125	0.009375	0.00625	0.003125	0.0015625	0.0003125	0.00109375
3.90625mg	0.0078125	0.00625	0.0046875	0.003125	0.0015625	0.00078125	0.00015625	0.000546875

Tabel 3. 2 Tabel Konversi Dosis (*Laurence dan Bacharach, 1964*)⁵⁸ Menurut

tabel *Laurence dan Bacharach* bahwa konversi:

dosis *cefadroxil* pada manusia : 70 kg

dosis ke tikus : 200g → 0,018

dengan perhitungan sebagai berikut:

dosis *cefadroxil* ke manusia : 500 mg.

dosis *cefadroxil* ke tikus : $(0,018 \times 500) \text{ mg} = 9 \text{ mg}$.

maka, dosis antibiotik *cefadroxil* yang diberikan ke tikus setelah dikonversi sebanyak 9 mg.²⁷

3.7. Identifikasi Variabel

3.7.1. Variabel Independen

Variabel independen ialah ekstrak daun sirih hijau (*Piper betle L.*).

3.7.2. Variabel Dependen

Variabel dependen ialah rasio neutrofil-limfosit (NLR) tikus Wistar yang terinfeksi *S. aureus*.

3.8. Definisi Operasional

No	Variabel	Definisi	Alat Ukur	Hasil Ukur	Skala Ukur
1.	Ekstrak daun sirih hijau (<i>Piper betle L.</i>)	Ekstrak yang dihasilkan dari proses ekstraksi daun sirih hijau dengan metode maserasi.	Timbangan digital	Dosis 300mg/KgBB, 500 mg/KgBB, dan 1000 mg/KgBB	Rasio
2.	Cefadroxil kapsul (generik)	Antibiotik generasi pertama sefalosporin	Timbangan digital	Dosis 9 mg	Rasio
3.	Rasio Neutrofil-Limfosit	Perbandingan jumlah sel neutrofil dan jumlah sel limfosit	<i>Hematology analyzer</i>	Hitung perbandingan neutrofil dan limfosit tikus yang terinfeksi <i>S.aureus</i> . NLR normal ⁵⁹ adalah < 5%	Rasio

Tabel 3. 3 Definisi Operasional

3.9. Analisis Data

Hasil pengolahan data penelitian dari setiap variabel dilakukan secara bertahap. Uji *Shapiro-Wilk* digunakan untuk menentukan normalitas data, dan dilanjutkan dengan uji homogenitas untuk menentukan apakah varian data sama untuk semua sampel. Data dinyatakan homogen dan terdistribusi normal pada uji homogenitas dan normalitas, sehingga dilanjutkan uji *One Way ANOVA* pada data yang tersisa.⁵⁶

