

BAB I

PENDAHULUAN.

1.1. Latar Belakang

Infeksi merupakan masalah kesehatan yang paling banyak terjadi di daerah Tropis, termasuk Indonesia. Infeksi disebabkan oleh bakteri, virus, jamur maupun patogen yang masuk ke dalam tubuh. Dari berbagai jenis penyebab infeksi tersebut, infeksi bakteri adalah infeksi yang paling banyak terjadi. *Escherichia coli* adalah salah satu bakteri yang paling sering menyebabkan penyakit infeksi di seluruh dunia, terutama di Negara berkembang.¹

Escherichia coli (*E. coli*) adalah bakteri gram negatif yang menjadi salah satu organisme penyebab dari berbagai penyakit. *Escherichia coli* merupakan flora normal bagi usus dan merupakan bakteri yang paling umum dijumpai di saluran pencernaan. Bakteri ini akan berubah menjadi patogen apabila jumlahnya sudah melebihi batas normal sehingga akan menginvasi saluran pencernaan yang akhirnya akan menimbulkan gejala.^{2,3}

Escherichia coli dapat menyebabkan berbagai penyakit seperti diare, meningitis akut, infeksi intra-abdominal, pneumonia, dan lain-lain. Meningitis pada bayi yang terinfeksi *Escherichia coli* menyebabkan kematian sekitar 20-40% di dunia. Diare akibat *Escherichia coli* adalah penyebab kematian kedua pada anak dengan usia kurang dari 5 tahun, serta menyebabkan kematian lebih dari 700.000 anak setiap tahun dan terdapat 1,7 miliar kasus diare pada setiap tahunnya.^{2,3} Infeksi *Escherichia coli* ini umumnya terjadi pada orang tua dengan usia 60-80 tahun. Diperkirakan kejadiannya di dunia mencapai 319 kasus dari 100.000 orang tua. Pada usia di bawah 50 tahun, tingkat kejadian infeksi *Escherichia coli* lebih sering terjadi pada wanita dibandingkan dengan pria. Namun, pada usia lebih dari 50 tahun, tingkat kejadian pada pria dan wanita sama.⁴

Infeksi *Escherichia coli* pernah menjadi wabah di beberapa negara. Pada tahun 2011, *Escherichia coli* tipe STEC menjadi wabah di Jerman. Bakteri ini menginfeksi 2400 orang, termasuk 852 pasien dengan infeksi *Hemolytic Uremic Syndrome* (HUS) dan terdapat 32 kematian yang terkait dengan HUS. Pada tahun 2019, ditemukan sebanyak 209 orang terinfeksi strain *Escherichia coli* 0103 di

Ketucky dan Georgia, Amerika Serikat. Terdapat 29 pasien yang harus di rawat di rumah sakit, dan 2 di antaranya juga terinfeksi HUS dan tidak terdapat kematian. Pada tahun 2020, 40 orang terinfeksi strain *Escherichia coli* 0157:H7 di Kanada. 20 orang mendapat perawatan di rumah sakit dan 4 orang di antaranya berkembang menjadi HUS. Di Indonesia prevalensi *Escherichia coli* masih sangat tinggi, hal ini dikarenakan proses pengolahan makanan yang masih kurang baik.⁵

Ketika terjadi infeksi, leukosit (sel darah putih) pada tubuh akan meningkat, disebut dengan leukositosis. Leukosit merupakan salah satu sel darah yang berperan khusus dalam pertahanan seluler dan juga humoral organisme terhadap zat-zat asing yang masuk ke dalam tubuh. Leukosit akan bekerja sama dengan immunoglobulin dan komplemen sebagai respon imun yang nantinya akan berfungsi sebagai pertahanan tubuh untuk melawan infeksi. Peningkatan dari leukosit ini menunjukkan adanya aktivitas pertahanan sistem kekebalan tubuh serta menunjukkan adanya peradangan dari jaringan.^{6,7}

Hasil penelitian yang dilakukan oleh Hadi dkk, menyatakan bahwa 2494 orang yang terinfeksi *Escherichia coli*, 43% diantaranya resisten terhadap berbagai jenis antibiotik, seperti: Ampisilin (34%), Kotrimaksazol (29%) dan Kloramfenikol (25%). Selain itu, 781 pasien yang dirawat di rumah sakit didapatkan 81% *Escherichia coli* resisten terhadap beberapa antibiotik, seperti Ampisilin (73%), Kotrimaksol (56%), Kloramfenikol (43%), Siprofloksasin (2%) dan Gentamisin (18%).⁸

Berdasarkan uraian diatas, sangat diperlukannya inovasi baru untuk menghindari semakin tingginya resistensi terhadap antibiotik. Seperti, pengembangan tanaman-tanaman yang diduga ataupun telah diteliti dapat memiliki khasiat sebagai antibakteri. Salah satu tanaman di Indonesia yang memiliki potensi sebagai tanaman obat adalah Daun kelor (*Moringa oleifera*). Daun kelor merupakan tanaman multiguna yang sudah dikenal sejak lama oleh masyarakat, penuh dengan nutrisi dan berkasiat obat.^{9,10} Tanaman ini mengandung zat besi yang lebih tinggi dari pada jenis sayuran lainnya yaitu sebesar 28,2 mg, serta nutrisi yang cukup tinggi baik untuk mengatasi masalah nutrisi serta mengandung 46 antioksidan kuat yang dapat menjaga tubuh dari radikal bebas serta manfaat lain bagi manusia. Daun

kelor ini juga terbukti tidak memiliki efek samping bila dikonsumsi oleh anak-anak maupun orang dewasa. Kandungan kelor ini juga baik dalam meningkatkan pembentukan dari Hemoglobin diantaranya seperti *quercetin*, zat besi (Fe) dan juga vitamin C. Selain itu, uji fitokimia pada daun kelor menunjukkan bahwa tanaman ini juga mengandung alkaloid, fenolat, flavonoid, triterpenoid/steroid dan tannin berfungsi sebagai antibakterial.^{10,11}

Berdasarkan dari uraian di atas, akhirnya peneliti tertarik untuk melakukan penelitian tentang pengaruh pemberian ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera*) terhadap jumlah leukosit tikus putih (*Rattus norvegicus*) yang terinfeksi *Escherichia coli*.

1.2. Rumusan Masalah

Apakah pemberian Ekstrak Daun Kelor (*Moringa oleifera*) berpengaruh terhadap jumlah Leukosit Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) yang terinfeksi *Escherichia coli*?

1.3. Hipotesa Penelitian

Ho: Terdapat perbedaan jumlah leukosit tikus putih (*Rattus norvegicus*) setelah pemberian ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera*) dalam beberapa dosis.

Ha: Tidak terdapat perbedaan jumlah leukosit tikus putih (*Rattus norvegicus*) setelah pemberian ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera*) dalam beberapa dosis.

1.4. Tujuan Penelitian

1.4.1. Tujuan Umum

Secara umum penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh dari pemberian ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera*) terhadap jumlah leukosit tikus putih (*Rattus norvegicus*) yang terinfeksi *Escherichia coli*.

1.4.2. Tujuan Khusus

Tujuan khusus dari penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Mengetahui jumlah leukosit tikus putih (*Rattus norvegicus*) yang terinfeksi *Escherichia coli* setelah pemberian ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera*).

2. Melihat apakah terdapat perbedaan jumlah leukosit tikus putih (*Ratus norvegicus*) yang terinfeksi *Escherichia coli* setelah pemberian ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera*) dalam beberapa dosis.

1.5. Manfaat Penelitian

1.5.1. Bagi peneliti

Menambah pengetahuan mengenai manfaat dari ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera*) terhadap jumlah leukosit tikus putih (*Ratus norvegicus*) yang terinfeksi *Escherichia coli*.

1.5.2. Bagi Institusi

Menambah referensi di Fakultas Kedokteran Universitas HKBP Nommensen dan dapat juga menjadi rujukan bagi penelitian selanjutnya.

1.5.3. Bagi Masyarakat

Hasil dari penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi kepada masyarakat mengenai pengaruh pemberian ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera*) terhadap leukosit tikus putih (*Ratus norvegicus*) yang terinfeksi *Escherichia coli*.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Leukosit

Leukosit atau juga dikenal dengan sel darah putih berperan dalam sistem kekebalan tubuh untuk melawan benda asing (antigen) yang masuk ke dalam tubuh. Pada umumnya peningkatan jumlah leukosit (leukositosis) ini disebabkan karena adanya infeksi atau kerusakan jaringan pada tubuh. Penurunan jumlah leukosit (leukopenia) dapat disebabkan karena penyakit atau kerusakan pada sumsum tulang, radiasi atau kemoterapi, adanya penyakit sistemik yang parah seperti lupus eritematosus.^{6,7}

Tabel 2.1 Jumlah Leukosit Normal.¹²

Usia/Jenis	Nilai rujukan
Dewasa	5000-10.000/ μ L
Anak	6200-17.000/ μ L
Neonatus	9000-30.000/ μ L
Neutrofil	2500-8000/ μ L
Limfosit	1000-4000/ μ L
Monosit	100-700/ μ L
Eosinofil	50-500/ μ L
Basofil	25-100/ μ L

Leukosit dibentuk di sumsum tulang yang dirangsang oleh *Colony Stimulating Factor* (CSF) yang dihasilkan dari leukosit matur (matang). Leukosit ini terbagi menjadi 2 jenis, yaitu:

a. Agranulosit

Agranulosit terdiri atas neutrofil, eosinofil, dan basofil.¹³

Neutrofil

Neutrofil memiliki granula yang tidak berwarna, memiliki inti sel yang terangkai, namun kadang seperti terpisah-pisah, protoplasmanya banyak berbintik-bintik halus/granula, serta jumlahnya paling banyak sekitar 60-70. ¹³

Eosinofil

Eosinofil memiliki granula yang berwarna merah dengan pewarnaan asam, ukuran dan bentuknya hampir sama dengan neutrofil, namun granula dalam sitoplasmanya lebih besar, dan jumlahnya sekitar 24%.¹³

Basofil

Basofil memiliki granuloma yang berwarna biru dengan pewarnaan basa, ukurannya lebih kecil dari eosinofil, tetapi memiliki inti yang berbentuk teratur, di dalam protoplasmanya terdapat granula yang besar, dan jumlahnya sekitar 0,5%.¹³

Neutrofil, eosinofil dan basofil berfungsi sebagai fagosit untuk menghancurkan mikroorganisme dan sisa-sisa sel. Selain itu, Basofil juga bekerja sebagai sel mast dan akan mengeluarkan peptide vasoaktif.¹³

b. Granulosit

Granulosit terdiri atas Limfosit dan Monosit.¹³

Limfosit

Limfosit memiliki nukleus yang besar bulat dan sebagian besar dari sel limfosit berkembang di jaringan limfe. Ukurannya bervariasi mulai dari 7-15 μ . Jumlahnya sekitar 20-25% serta fungsinya adalah membunuh dan memakan bakteri yang masuk ke dalam jaringan tubuh. Limfosit memiliki 2 jenis, yaitu limfosit T dan limfosit B.¹³

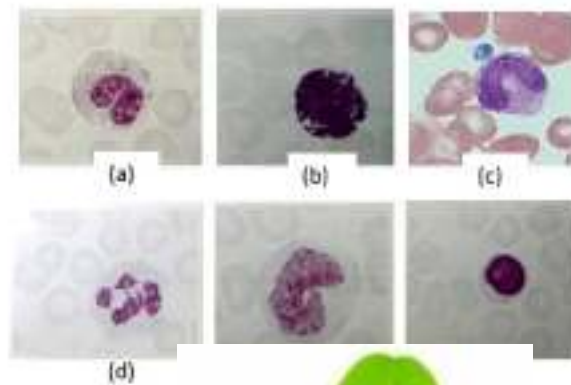
Limfosit T akan meninggalkan sumsum tulang dan akan bermigrasi menuju timus. Kemudian limfosit T akan meninggalkan timus dan beredar di dalam darah sampai limfosit T ini bertemu dengan antigen-antigen dan akan mengenalinya. Setelah dirangsang oleh antigen, sel-sel ini akan menghancurkan mikroorganisme tersebut.¹³

Limfosit B akan meninggalkan sumsum tulang dan akan bersirkulasi dalam darah sampai limfosit B bertemu dengan antigen dan akan mengenalinya. Pada tahap ini, limfosit B akan mengalami pematangan lebih lanjut dan akhirnya akan menghasilkan antibodi.¹³

Monosit

Monosit memiliki ukuran yang lebih besar dari limfosit, protoplasmanya besar, berwarna biru keabu-abuan, serta memiliki bintik-bintik berwarna

kemerahan. Inti selnya bulat atau panjang. Monosit dibentuk di sumsum tulang dan akan masuk ke dalam sirkulasi berbentuk imatur dan akan mengalami proses pematangan menjadi makrofag setelah masuk ke dalam jaringan, Monosit berfungsi sebagai fagosit, dan jumlahnya sekitar 34% dari total komponen sel darah putih.¹³



Gambar 2.1 Jenis-jenis le
neutrofi

sofil; (c) neutrofil stab; (d)
onosit.⁶

2.2. Daun Kelor



Gambar 2.2 Daun kelor.¹⁴

Kingdom : *Plantae*
 Divisi : *Magnoliophyta*
 Kelas : *Magnoliopsida*
 Ordo : *Brassicales*
 Famili : *Moringaceae*
 Genus : *Moringa*
 Spesies : *Moringa oleifera lamk.*

Kelor dikenal dengan berbagai nama, yaitu *drumstick tree*, *horseradish tree*, *miracle tree*, *benzolive*, *maronga mlonge*, *magic tree*, *moonga*, *sajna*, *mulangay*, atau *Ben oil tree*. Di Indonesia, tanaman ini juga dikenal dalam beberapa nama, seperti di masyarakat Sulawesi Tanaman ini di kenal dengan sebutan *wori*, *keru*, *keloro* atau *kelo*; *murong* di Aceh; *kelor* di masyarakat Sunda dan Melayu; *maronggih* di Madura; *kelo* di Ternate; *kawona* di Sumbawa; dan *munggai* di Sumatera Barat.¹⁵

Moringa oleifera ini dapat berupa semak dan dapat juga berupa pohon dengan tinggi 12 m, serta berdiameter 30 cm. Kayunya termasuk jenis kayu lunak dan berkualitas rendah. Daun kelor ini memiliki karakteristik bersirip yang tidak sempurna, berbentuk seperti telur, kecil dan sebesar ujung jari. Daunnya berwarna hijau hingga berwarna kecoklatan, bentuknya seperti telur terbalik atau bundar telur, panjangnya 1-3 cm, lebar 4mm sampai 1 cm, pangkal daunnya membulat, ujung daun berbentuk tumpul, dan tepi dari daun ini rata. Kulit akarnya berbau tajam, berasa dan juga pedas, dalamnya berwarna kuning pucat, memiliki garis halus yang terang dan juga melintang. Lunak, permukaan kulitnya agak licin, bentuknya tidak beratuan, permukaan bagian dalamnya agak berserabut, kayunya berwarna coklat muda atau krem berserabut, dan sebagian besar terpisah.¹⁴

Tumbuhan ini sudah dikenal sebagai tumbuhan multiguna sejak lama, hal ini karena tanaman ini terbukti secara alamiah mengandung kandungan yang sangat bermanfaat. Daun kelor mengandung lebih dari 90 jenis nutrisi, yang berupa asam amino, vitamin esensial, mineral, antiinflamasi dan antipenuaan, serta mengandung 539 senyawa yang digunakan dalam pengobatan tradisional.¹⁶

Semua bagian dari kelor memiliki kandungan senyawa sekunder yang sangat bermanfaat. Bunga kelor mengandung alkaloid, asam amino, sukrosa dan flavonoid seperti *isoquercitrin*, kafein dan *rhamnetin*.^{15,16} Bagian daun, bunga, akar, biji, minyak dan kulit kayu dari tumbuhan kelor ini mengandung antimikroba yang sering dimanfaatkan masyarakat untuk mengobati kulit yang terkena jamur dengan cara digosokkan ke bagian kulit yang terkena jamur tersebut.¹⁶

Daun kelor mengandung alkaloid, saponin, tanin dan flavonoid. Manfaat daun kelor yang diketahui antara lain sebagai antibiotik, antiulkus,

antitripanosomal, antiinflamasi, dan hipotensif. Pertumbuhan dari *Streptococcus mutans* dan *Malassezia furfur* dapat dihambat oleh saponin, flavonoid, triterpenoid dan tanin yang terdapat pada daun kelor. Daun kelor juga mengandung alkaloid, saponin dan flavonoid yang dapat menghambat dari pertumbuhan bakteri *Escherichia coli* dan *Salmonella typhi*. Ekstrak daun kelor juga mempunyai aktivitas sebagai antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus*.¹⁵

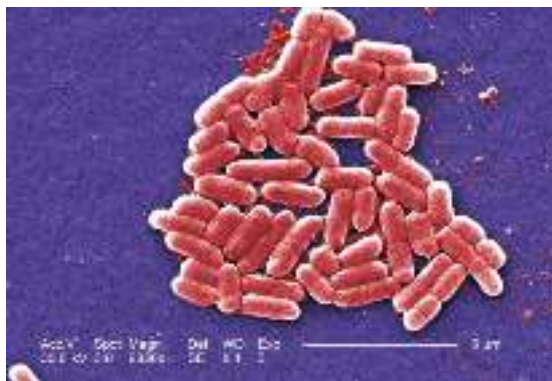
Daun kelor juga mengandung antioksidan yang dapat menghambat reaksi oksidasi terhadap radikal bebas. Antioksidan berperan dalam penetralan radikal bebas dengan melepaskan elektron dan mereduksi ion logam. Senyawa flavonoid dan fenolik berperan sebagai antioksidan, karena flavonoid dan fenolik mengandung gugus hidroksil yang dapat melepaskan *hydrogen* hingga akhirnya dapat menetralkan radikal bebas. Saat ini, antioksidan yang alami sangat diminati karena penggunaan antioksidan sintesis memiliki beberapa efek samping.^{15,16}

Kandungan gizi yang dimiliki oleh daun kelor sangat bermanfaat dalam melawan malnutrisi. Beberapa Negara berkembang khususnya dengan masalah nutrisi banyak mengonsumsi daun kelor, yang bertujuan untuk memperbaiki gizi pada bayi dan ibu menyusui. Biasanya daun kelor dikonsumsi sebagai sayuran. Daun kelor mengandung protein dan asam amino yang sangat baik dibandingkan dengan kacang kedelai. Protein ini baik untuk tubuh, bahkan saat tubuh tidak mendapat asupan dari protein hewani. Jenis asam amino seperti arginine dan histini juga terdapat pada daun kelor yang sangat baik untuk pertumbuhan dan perkembangan bayi. Daun kelor juga mengandung asam lemak yang berguna untuk kesehatan seperti omega-3 dan omega-6. Serta, daun kelor mengandung vitamin dan mineral.^{15,16}

Daun kelor juga bermanfaat sebagai antikanker, daun kelor memiliki aktivasi antiproliferative pada beberapa jenis sel kanker, yaitu sel kanker paru A549, sel kanker hati HepG2, serta sel kanker payudara T47D dan MDA-MB-231, serta menurut penelitian daun kelor juga terbukti dapat menurunkan aktifitas *cell line* kanker payudara MCF-7. Selain flavonoid, kandungan kelor lainnya yang membuatnya memiliki kandungan anti kanker adalah *benzyl carbamate*, *isothiocyanates*, *beta-sitosterol* dan *niazimicin* pada bagian daun dan bijinya. Serta

daun kelor juga memiliki antidiabetes serta tidak mengandung efeksamping sehingga tanaman ini sangat baik bagi penderita diabetes tipe 1 maupun tipe 2. Di mana, Kelor mengandung vitamin c yang berfungsi membantu sekresi dari insulin.¹⁵

2.3. *Escherichia coli*



Gambar 2.3 *Escherichia coli*¹⁷

Escherichia coli merupakan bakteri gram negative, berdasarkan O2 *Escherichia coli* memiliki sifat fakultatif anaerob, yaitu dapat membentuk ATP dengan respirasi aeoronik jika mendapat oksigen, namun dapat beralih ke fermentasi atau respirasi anaerob jika tidak mendapat oksigen. *Escherichia coli* memiliki sifat yang unik yaitu dapat menyebabkan infeksi primer di usus, serta mengakibatkan diare pada anak dan terjadinya *travelers diarrhea*, juga memiliki kemampuan untuk menimbulkan infeksi pada jaringan tubuh lainnya. Bakteri memiliki dua jenis genus yaitu: *Escherichia coli* dan *Escherichia hermannii*.^{18,19}

2.3.1. Taksonomi *Escherichia coli*

Domain	: <i>Bacteria</i>
Kingdom	: <i>Eubacteria</i>
Filum	: <i>Proteobacteria</i>
Kelas	: <i>Gammaproteobacteria</i>
Ordo	: <i>Enterobacteriales</i>
Famili	: <i>Enterobacteriaceae</i>
Genus	: <i>Escherichia</i>
Spesies	: <i>Escherichia coli</i> ¹⁹

2.3.2. Morfologi

Escherichia coli ini berbentuk batang pendek (kokobasil), bakteri gram negatif, ukurannya $0,4-0,7 \mu\text{m} \times 1,4 \mu\text{m}$, sebagian besar geraknya positif dan pada beberapa strainnya mempunyai kapsul. Bakteri ini juga bersifat fakultatif anaerob, motil serta tidak memiliki spora. *Escherichia coli* tumbuh pada berbagai media seperti agar *Mueller-Hintin*, agar *MacConkey*, agar darah, dan juga agar nutrisi. Pada umumnya semua bakteri famili *Enterobacteriaceae* dapat memfermentasi glukosa, mereduksi nitrat, serta pada uji katalase positif dan pada uji oksidase negatif. *Escherichia coli* biasanya akan menghasilkan hasil yang positif pada tes indol, lisin, dekarboksilase, serta fermentasi manitol, dan akan menghasilkan gas dari glukosa. Pada media *Eosin Methylene Blue* (EMB), *Escherichia coli* akan membentuk koloni yang berwarna hijau metalik yang khas, hal ini dikarenakan *Escherichia coli* dapat memfermentasi laktosa dengan kuat.^{18,20}

2.3.3. Struktur Antigen

Escherichia coli memiliki antigen O, H dan K. Pada saat ini telah ditemukan 50 tipe antigen H (flagella), 90 tipe antigen K (kapsular), dan 150 tipe antigen O (polisakarida). Antigen O adalah bagian yang paling luar dari lipopolisakarida dari dinding sel, serta terdiri atas unit polisakarida yang berulang. Beberapa dari polisakarida O-spesifik mengandung glukosa yang unik, antigen O ini juga resisten terhadap panas dan juga alcohol, dan biasanya akan terdeteksi oleh aglutinasi bakteri, antibodi utama dari antigen O ini adalah IgM.^{18,21}

Antigen K terletak pada bagian luar dari antigen O, antigen K ini akan mengganggu aglutinasi dengan antiserum O, serta dapat berhubungan dengan virulen, pada *Escherichia coli* sendiri akan menghasilkan antigen K1, serta antigen yang dihasilkan oleh *Escherichia coli* ini akan menyebabkan perlekatan bakteri pada sel epitel sebelum menginvasi ke saluran cerna maupun saluran kemih.¹⁸

Antigen H sendiri terdapat pada flagela dan dapat dirusak oleh panas ataupun alcohol. Antigen H ini beraglutinasi dengan antibodi anti-H, terutama IgG. Penentuan pada antigen H ini adalah fungsi sekuens asam amino pada protein flagel (flagelin).¹⁸

2.3.4. Patogenesis

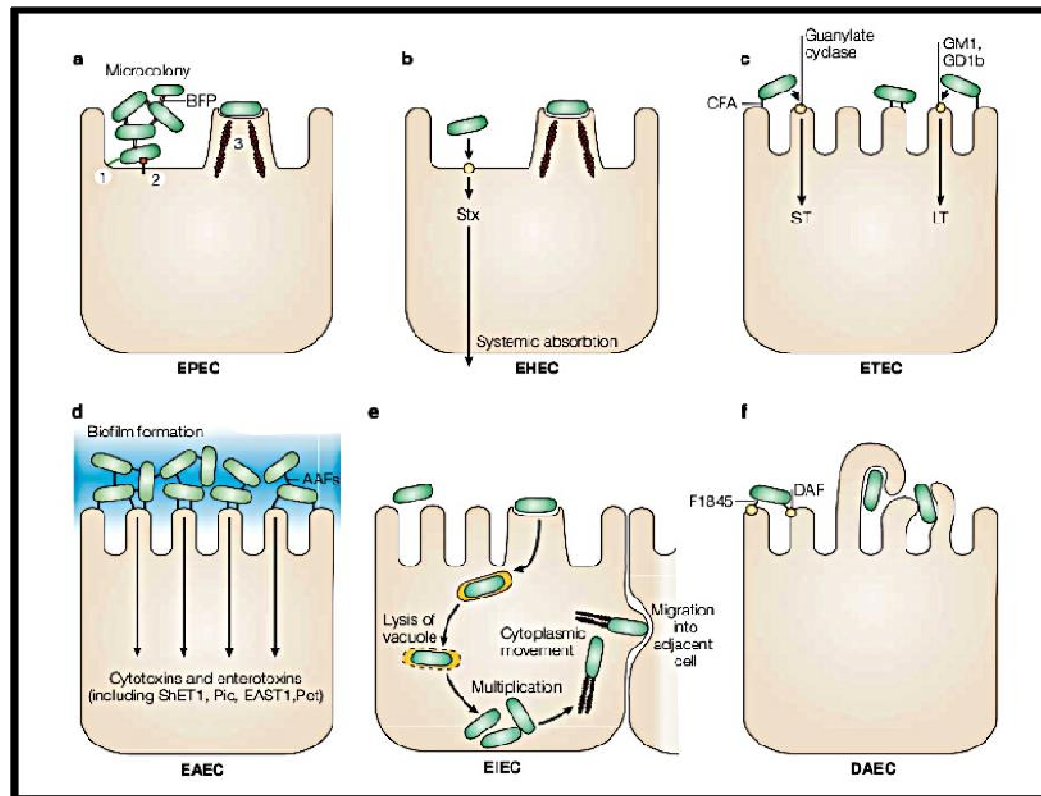
Escherichia coli dapat menimbulkan gejala bila masuk ke tubuh inangnya dan kemudian beradaptasi dan bertahan dalam tubuh manusia. *Escherichia coli* kemudian akan menyerang sistem imun dan akan menimbulkan penyakit. Pada tahap ini, *Escherichia coli* akan melakukan koloni pada titik tertentu di sel mukosa usus, yang akhirnya akan merusak sel usus, kemudian koloni ini akan melintasi sel-sel usus dan masuk ke aliran darah, kemudian akan menargetkan organ dan terjadilah kerusakan organ.¹⁸

Escherichia coli memiliki beberapa patotipe yang paling terkenal menyebabkan penyakit, yaitu ETEC (*Enterotoxigenic Escherichia coli*), EPEC (*Enteropathogenic Escherichia coli*), EAEC (*Enteraggregative Escherichia coli*), EHEC / STEC (*Enterohemorrhagic Escherichia coli/Shiga-Toxin Producing Escherichia coli*) dan EIEC (*Enteroinvasive Escherichia coli*). Patogenitas *Escherichia coli* dapat ditentukan berdasarkan faktor atau gen virulensi spesifik yang dimiliki bakteri dan masing-masing patotipe ini akan menyebabkan gejala klinis tertentu yang berbeda.²⁰

Beberapa jenis *Escherichia coli* yang memiliki sifat virulensi spesifik sehingga mereka mampu bertahan dan beradaptasi dengan baik. Jenis virulensi ini sering dikodekan pada unsur-unsur genetik yang dapat dimobilisasi ke dalam berbagai strain untuk menciptakan kombinasi baru dari faktor virulensi, kombinasi faktor virulensi yang paling berhasil akhirnya menjadi spesifik “pathotypes” dari *E. coli* yang mampu menyebabkan penyakit pada individu yang sehat, seperti penyakit enterik/diare, infeksi saluran kemih (ISK), sepsis dan meningitis. *Urinary Tract Infections* (UTI atau ISK) adalah infeksi ekstraintestinal *E. coli* yang paling umum dan disebabkan oleh *Uropathogenic E. coli* (UPEC). Infeksi ekstraintestinal yang paling sering adalah meningitis dan sepsis, terutama *meningitis-associated E. coli* (MNEC). *Escherichia coli* patogen dapat dikategorikan menjadi 6 kategori, yaitu:²²

1. *Enteropathogenic E. coli* (EPEC)
2. *Enterohaemorrhagic E. coli* (EHEC)
3. *Enterotoxigenic E. coli* (ETEC)
4. *Enteraggregative E. coli* (EAEC)

5. *Enteroinvasive E. coli*(EIEC)
6. *Diffusely Adherent E. coli*(DAEC)



Gambar 2.4 Skema patogenik *E. coli*²²

Gambar A. EPEC melekat pada *enterocyteus* kecil, menghancurkan arsitektur *microvillar* yang normal, menginduksi lesi yang melekat dan tidak terlihat. Sehingga terjadi gangguan *cytoskeletal* disertai dengan respon inflammasi dan diare. 1) *Initial adhesion*, 2) *Protein translocation by type III secretion*, 3) *Pedestal formation*.

Gambar B. EHEC juga menginduksi lesi di usus besar. Ciri khas EHEC adalah elaborasi *Shiga toksin*(Stx), absorpsi sistemik yang mengarah pada komplikasi yang berpotensi mengancam kehidupan.

Gambar C. ETEC akan menginduksi sekresi enterotoksin *heat-labile* (LT) dan atau *heat-stable*(ST) sehingga terjadi diare cair.

Gambar D. EAEC di epitel usus kecil dan besar dalam biofilm tebal dan menguraikan enterotoksin sekretorik dan sitotoksin.

Gambar E. EIEC menginvasi sel epitel kolon, melenyapkan *phagosome* dan bergerak melalui sel dengan nukleasi aktin mikrofilamen. Bakteri mungkin bergerak lateral melalui epitel dengan penyebaran sel-sel-sel langsung atau mungkin keluar dan masuk kembali ke membran plasma basolateral.

Gambar F. DAEC memunculkan efek transduksi sinyal karakteristik pada enterosit usus kecil yang bermanifestasi sebagai pertumbuhan proyeksi seluler.²²

Evolusi *Escherichia coli* menghasilkan pembentukan *pathotypes* berbeda yang mampu berkolonisasi di saluran gastrointestinal, saluran kemih atau meninges menggambarkan bagaimana strain genetik dapat beradaptasi ke lingkungan host yang berbeda. Proses evolusi telah menghasilkan spesies yang sangat yang mampu mampu berkolonisasi, melipatgandakan, dan merusak lingkungan yang beragam. Aktivitas sel inang yang dipengaruhi oleh strain patogen *Escherichia coli* ini mencakup spektrum fungsi yang luas, termasuk transduksi sinyal, sintesis protein, fungsi mitokondria, fungsi sitoskeletal, pembelahan sel, sekresi ion, transkripsi dan apoptosis.^{20,22}

2.4. Tikus Putih Wistar (*Rattus norvegicus*)

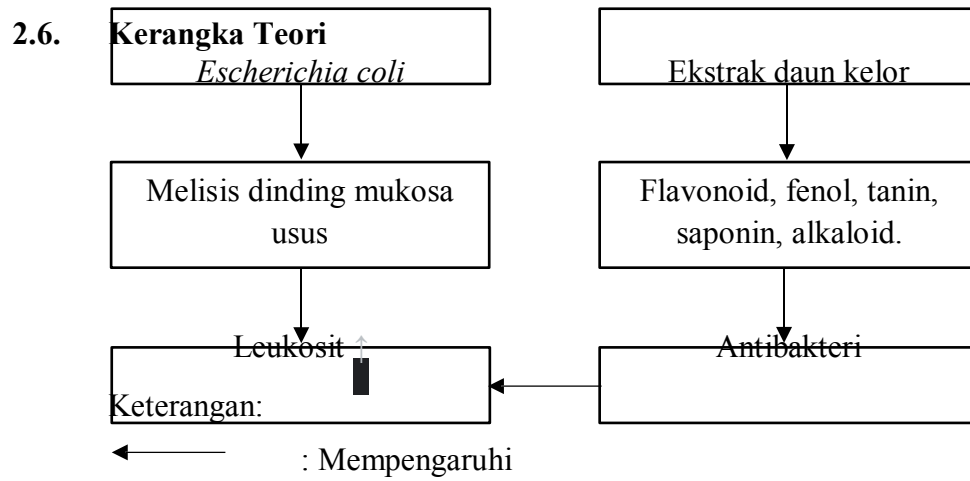
Tikus banyak digunakan dalam uji keamanan, kemanjuran atau keberhasilan obat, nutrisi, penuaan, obesitas yang diinduksikan, dan model bedah. Tikus yang paling sering digunakan dalam berbagai penelitian adalah tikus putih karena keunggulan yaitu tubuh yang kecil, sehingga mudah dalam pemeliharaan dan penanganannya. Tikus putih yang paling sering digunakan adalah tikus putih wistar jantan (*Rattus norvegicus*) karena memiliki daya adaptasi yang sangat baik. Tikus wistar jantan lebih sering digunakan karena keadaan emosi yang lebih stabil dibandingkan dengan tikus betina.²¹

Tabel 2.2 Parameter biologis tikus menurut Sparague Dawley.²¹

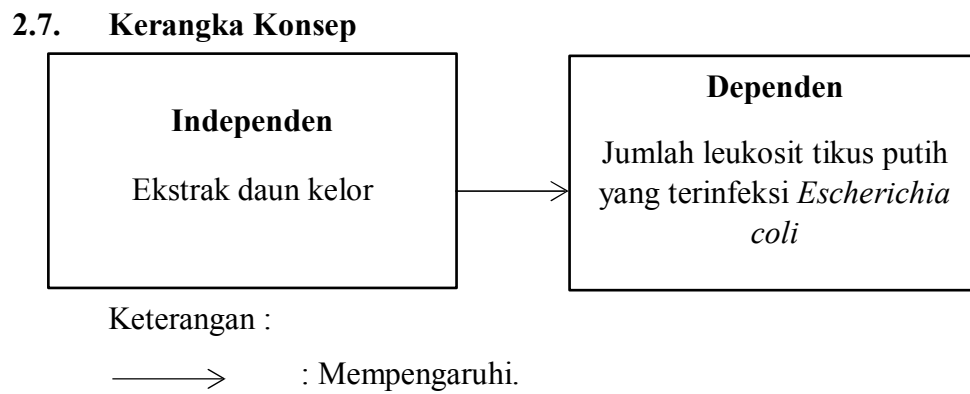
Parameter tikus	Nilai
Berat badan jantan dewasa	200-250 gr
Berat badan betina dewasa	180-220 gr
Suhu tubuh	35,9-37,5

2.5. Metode Ekstraksi

Ekstraksi merupakan mengambil sari dari zat aktif yang diinginkan dari bahan mentah dengan menggunakan pelarut tertentu yang dipilih. Metode Ekstraksi yang digunakan adalah pemisahan bagian aktif yang memiliki khasiat dari bagian yang tidak aktif. Setelah ekstrak diperoleh, dapat digunakan menjadi obat-obatan dapat seperti ekstrak cair serta dapat diproses lebih lanjut untuk dibuat dalam bentuk tablet ataupun kapsul. Berbagai penelitian menunjukkan bahwa hasil ekstrak ini dapat digunakan bukan hanya pada manusia, tapi dapat juga digunakan pada hewan, salah satunya adalah tikus.



Gambar 2.5 Kerangka Teori



Gambar 2.6 Kerangka Konsep

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

3.1. Desain Penelitian

Jenis penelitian yang dilakukan pada penelitian ini adalah Eksperimental dengan desain *Post Test with Control Group Design*, yaitu jenis penelitian yang melakukan pengamatan terhadap kelompok control dan perlakuan setelah diberikan suatu tindakan.

3.2. Waktu dan Tempat Penelitian

3.2.1. Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan Oktober-Desember 2022.

3.2.2. Tempat Penelitian

Pembuatan dari ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera*) dilakukan di Laboratorium Farmasi Universitas Sumatera Utara, begitupun dengan penelitian efektifitas daun kelor (*Moringa oleifera*) terhadap leukosit tikus putih (*Rattus norvegicus*) yang terinfeksi *Escherichia coli* juga dilakukan di Laboratorium Farmasi Universitas Sumatera Utara.

3.3. Populasi dan Sampel Penelitian

3.3.1. Populasi

Populasi dalam penelitian ini adalah tikus putih wistar (*Rattus norvegicus*) jantan.

3.3.2. Sampel

Sampel pada penelitian ini adalah 27 ekor tikus putih wistar (*Rattus norvegicus*) yang memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi dan diinduksi bakteri *Escherichia coli*. Sampel dibagi menjadi 3 kelompok. Satu kelompok merupakan kelompok kontrol (P1) yaitu kelompok yang hanya diinduksi *Escherichia coli*. Dua kelompok yaitu kelompok perlakuan P2 dan P3 merupakan kelompok yang diinduksi dengan *Escherichia coli* dan diberikan ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera*) dengan dosis 150 mg/kgBB pada kelompok P2 dan dosis 250 mg/kgBB pada kelompok perlakuan P3.

Bakteri *Escherichia coli* didapatkan dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Sumatera Utara. Daun kelor (*Moringa oleifera*) dan tikus putih (*Rattus norvegicus*) diperoleh dari Medan, Sumatera Utara.

Besar sampel dihitung dengan menggunakan rumus *Federer*, yaitu :

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

Keterangan:

t = jumlah perlakuan.

n = besar sampel (pengulangan).

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

$$(3-1)(n-1) \geq 15$$

$$2(n-1) \geq 15$$

$$2n-2 \geq 15$$

$$2n \geq 15+2$$

$$2n \geq 17$$

$$n \geq 17 : 2$$

$$n \geq 8,5$$

9 sampel dalam 1 kelompok.

$$\text{Besar sampel} = t \times n$$

$$= 3 \times 9$$

$$= 27 \text{ ekor tikus.}$$

3.4. Kriteria Inklusi dan Kriteria Eksklusi

3.4.1. Kriteria Inklusi

Kriteria inklusi sampel penelitian ini adalah:

1. Berat badan tikus putih (*Rattus norvegicus*) 150-250 gram.
2. Tidak terpengaruhi atau dipengaruhi dalam penelitian sebelumnya.
3. Tikus yang terinfeksi *Escherichia coli*.

3.4.2. Kriteria Eksklusi

Kriteria eksklusi sampel penelitian ini adalah

1. Tikus yang mati selama perlakuan.
2. Tikus yang sakit selama perlakuan.

3.5. Metode Pengumpulan Data

Metode pengumpulan data dari penelitian ini adalah menggunakan data primer, yaitu data yang diperoleh langsung oleh peneliti sendiri serta hasil pengukuran berupa pengaruh ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera*).

3.6. Prosedur Kerja Penelitian

1. Peneliti meminta izin dengan mengurus *ethical clearance*.
2. Peneliti meminta izin permohonan pelaksanaan penelitian yang akan diajukan pada institusi pendidikan Fakultas Kedokteran Universitas HKBP Nommensen.
3. Diajukan izin permohonan pelaksanaan penelitian pada laboratorium tempat penelitian.
4. Persiapan hewan uji.

Hewan uji diadaptasi selama 7 hari di *animal house*. Hewan uji yang dipakai sebanyak 27 ekor tikus, dan dikelompokkan menjadi 3 kelompok uji. Masing-masing kelompok terdiri dari 9 ekor tikus, kemudian diletakkan di dalam 1 kandang pada setiap kelompoknya. Pada tahap ini tikus hanya diberi pakan dan minum selama 7 hari.

Hewan uji diberi pakan dan minum setiap hari agar hewan uji tidak merasa lapar dan haus.

Hewan uji diperlakukan secara manusiawi, yaitu dengan melaksanakan prinsip 3R dan 5F.

Prinsip 3R

- Replacement, menggunakan hewan dengan mengambil darahnya.
- Reduction, menggunakan hewan sebanyak 27 ekor tikus putih galur wistar jantan, dan membagi tikus menjadi 3 kelompok.
- Refinement, memperlakukan hewan secara manusiawi, serta meminimalisir rasa sakit pada tikus saat pengambilan darah.

Prinsip 5F

- Bebas dari rasa haus dan lapar dengan memberikan minum dan pakan yang sesuai dengan kebutuhan tikus.

- Bebas dari rasa tidak nyaman, dengan menggunakan ukuran kandang yang sesuai dengan *guide for the care use of laboratory animal* dan menyediakan tempat yang bersih.
- Bebas dari rasa sakit, pengambilan darah akan dilakukan melalui jantung tikus dengan demikian maka dilakukan pembiusan total terlebih dahulu kepada tikus sebelum pembedahan.
- Bebas dari rasa takut dan stres, dengan cara memberikan masa adaptasi selama 7 hari.
- Bebas untuk mengekspresikan tingkah laku alamiah dengan cara memberikan ruang dan fasilitas yang sesuai, serta dalam satu kandang hanya terdapat 5 tikus.

5. Alat dan bahan penelitian :

Alat-alat yang di gunakan dalam penelitian ini adalah:

Alat test leukosit, spuit, jarum, gelas ukur, belender, kain lap, kertas saring, cawan penguap, *rotary vacuum evaporator*, corong, cawan penguap, tabung reaksi, ose, *erlenmeyer*, rak tabung reaksi, spatula batang pengaduk, cawan petri, pembakar bunsen, gelas objek, *deck glass*, mikroskop, pipet tetes, mikrotetes, inkubator, *laminar air flow*, timbangan digital, autoklaf, *microwave*, *freeze-dryer*, pelubang gabus, *vortex*, dan jangka kosong.

Kandang pemeliharaan tikus, terdiri atas wadah makan dan minum, label penanda, timbangan hewan, kapas dan pelester.

Container box (untuk tempat penyimpanan sampel darah sementara)

Bahan-bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah: ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera*), *aquadest*, etanol, alkohol, *Eosin Methylen Blue* (EMB), *Nutrient Broth* (Oxoid), *Dimethyl Sulfoxoide* (DMSO), reagen pewarna Gram, dan bakteri *Escherichia coli*.

6. Pembuatan Ekstrak

Ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera*) dibuat dengan metode maserasi menggunakan pelarut etanol 96%. Sebanyak 3 kg daun kelor dibersihkan dari kotoran, dicuci dengan air mengalir sampai bersih dan dikeringkan dalam lemari

pengering dengan lampu 40 watt selama kurang 5 hari. Setelah kering, daun kelor haluskan menjadi serbuk dengan menggunakan blender. Daun kelor yang telah halus dimaserasi dengan mencampurkan 3L etanol 96% ke dalam bejana kemudian di tutup rapat dan di diamkan selama 24 jam sambil diaduk sesekali. Setelah 24 jam, luran dari daun kelor disaring sehingga diperoleh filtrat dan ampas. Selanjutnya dilakukan perendaman kembali terhadap sisa ampas tersebut dengan menggunakan etanol 96% sebanyak 3l selama 24 jam sambil diaduk sesekali. Setelah 24 jam disaring dengan menggunakan corong dan kertas saring dan ditampung. Setelah itu, semua filtrat yang telah terkumpul dimasukkan ke dalam *rotary vacuum evaporator*, kemudian filtrat yang tersisa diuapkan dengan menggunakan cawan penguap di dalam *waterbath* sehingga diperoleh ekstrak yang kental.¹⁰

7. Bakteri yang digunakan dalam penelitian ini adalah bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922TM yang diberikan kepada setiap tikus sebanyak 1 ml dengan menggunakan ose.

8. Pengujian

Pada hari pertama dilakukan adaptasi selama 7 hari terlebih dahulu.

Pada hari ke-8, diberikan bakteri *Escherichia coli* pada kelompok kontrol dan 2 kelompok perlakuan.

Pada hari ke-12, kelompok P2 dan P3 diberikan ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera*) dengan kelompok P2 mendapatkan dosis 150 mg/kgBB/hari dan kelompok P3 mendapat dosis 250 mg/kgBB/hari selama 7 hari.

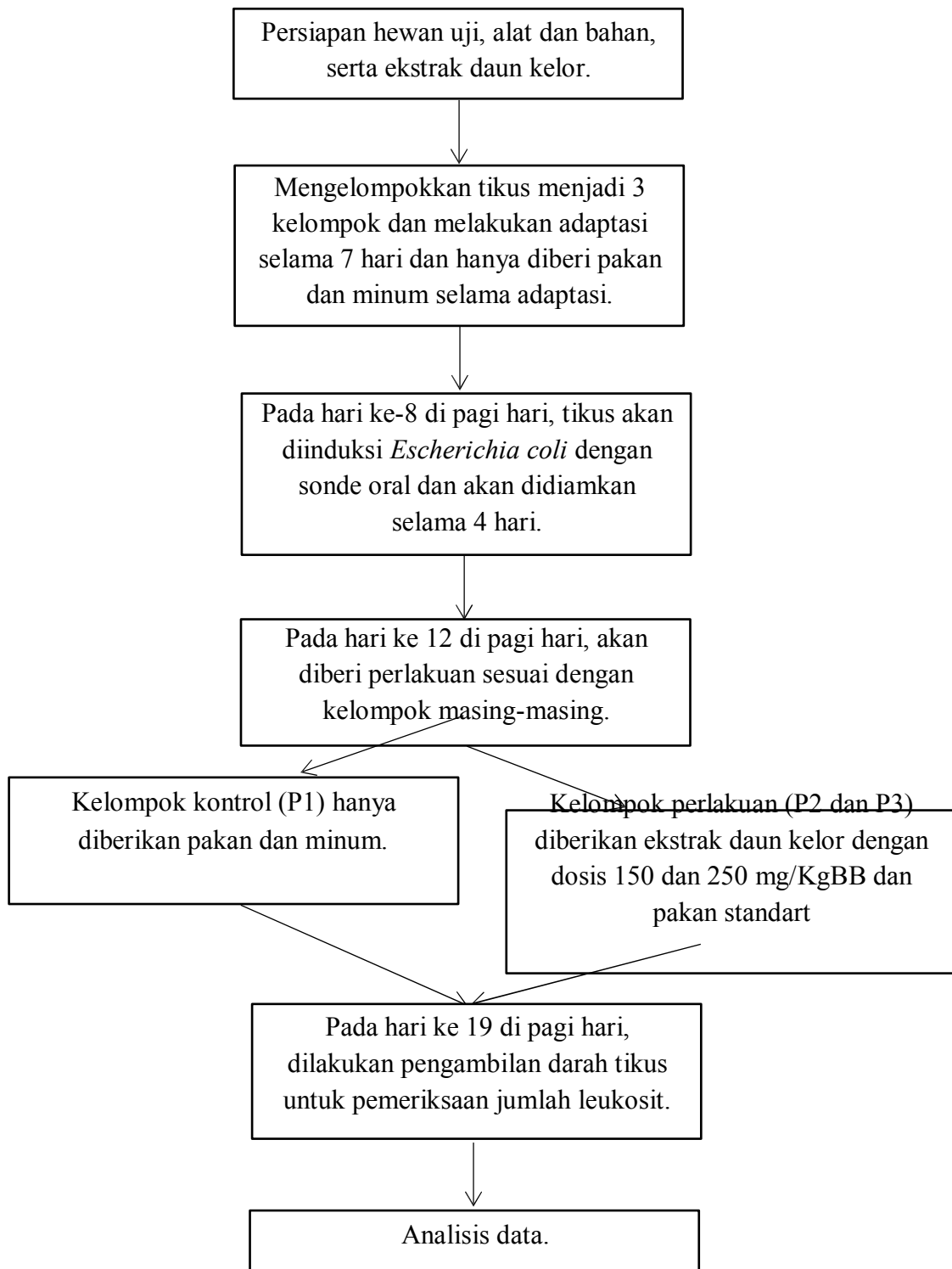
Pada hari ke 19, dilakukan pemeriksaan jumlah leukosit tikus pada semua kelompok.

9. Cara pengambilan sampel leukosit darah tikus

Tikus dimasukkan ke dalam sebuah box yang sudah dioleskan *Chloroform*. Setelah kesadaran tikus hilang maka dilakukan pembedahan untuk mengambil darah dari jantung tikus dengan menggunakan spuit.

10. Darah yang telah di dapatkan dimasukkan ke dalam tabung EDTA dan kemudian diperiksa di laboratorium kesehatan daerah untuk dilakukan pembacaan hasil jumlah leukosit.²³

3.7. Diagram Alur Penelitian



Gambar 3.1 Alur Penelitian

3.8. Identifikasi Variabel

3.8.1. Variabel Independen

Pemberian ekstrak daun kelor.

3.8.2. Variabel Dependen

Jumlah leukosit tikus putih (*Rattus norvegicus*) setelah terinfeksi *Escherichia coli*.

3.9. Definisi Operasional

Tabel 3.1 Definisi operasional

No.	Variabel	Definisi operasional	Alat ukur	Hasil Ukur	Skala Ukur
1.	EkstrakEtanol Daun Kelor	Ekstrak etanol daun kelor merupakan ekstrak daun kelor yang diperoleh melalui proses ekstraksi dari daun kelor melewati berbagai proses seperti maserasi, filtrasi dan penambahan etanol.	Timbangan digital	150 mg/kgBB 250 mg/kgBB	Rasio
2.	Jumlah Leukosit Tikus	Nilai jumlah leukosit darah yang dihitung dengan menggunakan sampel darah sebanyak 1 ml dari masing-masing tikus wistar putih.	<i>Hematology analyzer</i>	Normal leukosit tikus 2.000-10.000/ μ L	Rasio

3.10. Analisis Data

Data yang diperoleh dianalisis secara statistik dengan menggunakan perangkat lunak komputer menggunakan uji *Saphiro-Wilk*. Selanjutnya, digunakan uji *One way Anova* untuk mengetahui perbandingan rerata dari aktivitas kelompok tikus yang diberi ekstrak daun kelor dengan dosis 150 mg/kgBB, kelompok tikus yang diberi ekstrak daun kelor dengan dosis 250 mg/kgBB, serta kelompok kontrol yang tidak diberikan ekstrak daun kelor.