

**PENGARUH PEMBERIAN SALEP EKSTRAK DAUN SIRIH HIJAU
(*Piper betle*) TERHADAP JUMLAH SOD DAN NRF2 PADA TIKUS
(*Rattus norvegicus*) MODEL LUKA INSISI YANG
DIINFEKSI DENGAN *Methicillin-Resistance*
Staphylococcus aureus (MRSA)**

SKRIPSI

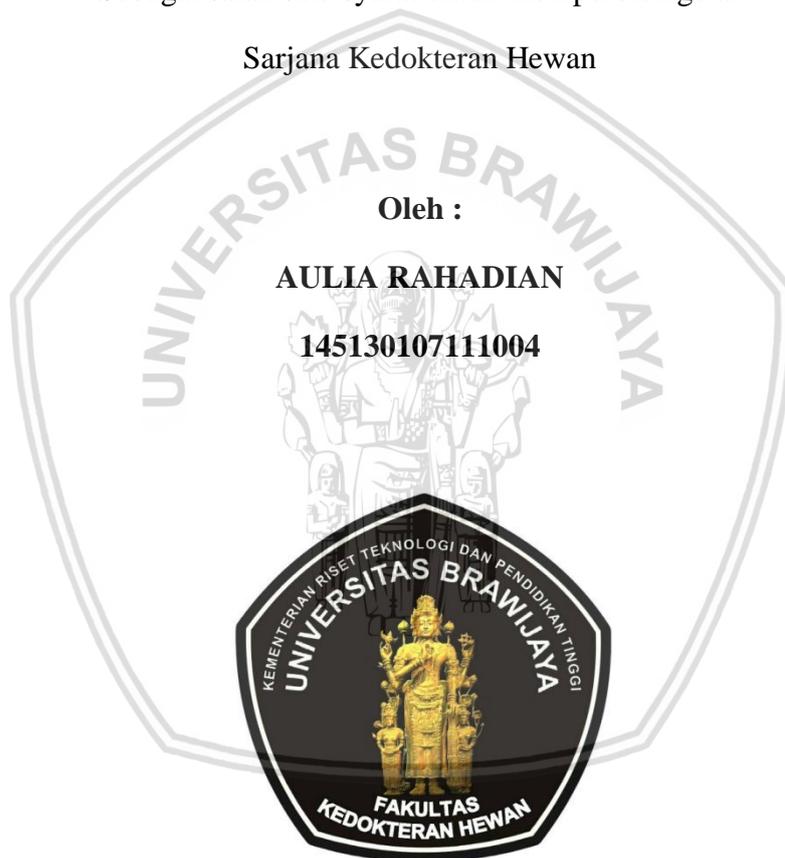
Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar

Sarjana Kedokteran Hewan

Oleh :

AULIA RAHADIAN

145130107111004



PROGRAM STUDI KEDOKTERAN HEWAN

FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

MALANG

2018

LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI

**PENGARUH PEMBERIAN SALEP EKSTRAK DAUN SIRIH HIJAU
(*Piper betle*) TERHADAP JUMLAH SOD DAN NRF2 PADA TIKUS
(*Rattus norvegicus*) MODEL LUKA INSISI YANG
DIINFEKSI DENGAN *Methicillin-Resistance*
Staphylococcus aureus (MRSA)**

Oleh :

AULIA RAHADIAN

145130107111004

Setelah dipertahankan di depan Majelis Penguji
pada tanggal 6 Juli 2018
dan dinyatakan memenuhi syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Kedokteran Hewan

Pembimbing I

Pembimbing II

Prof. Dr. Aulanni'am, drh., DES

NIP. 19600903 198802 2 001

drh. Dian Vidiastuti, M.Si

NIP. 19820207 200912 2 003

Mengetahui,
Dekan Fakultas Kedokteran Hewan
Universitas Brawijaya

Prof. Dr. Aulanni'am, drh., DES

NIP. 19600903 198802 2 001



LEMBAR PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan dibawah ini:

Nama : Aulia Rahadian

Nim : 145130107111004

Program Studi : Pendidikan Dokter Hewan

Penulis Skripsi berjudul :

Pengaruh Pemberian Salep Ekstrak Daun Sirih Hijau (*Piper betle*) Terhadap Jumlah SOD dan NRF2 pada Tikus (*Rattus norvegicus*) Model Luka Insisi yang Diinfeksi dengan *Methicillin—Resistance Staphylococcus aureus* (MRSA)

Dengan ini menyatakan bahwa:

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

Demikian pernyataan ini dibuat dengan segala kesadaran

Malang, 6 Juli 2018

Yang menyatakan,

Aulia Rahadian

NIM.145130107111004

KATA PENGANTAR

Puji syukur kehadiran Allah SWT yang mengatur segala urusan manusia dan atas segala limpahan rahmat, taufik, serta hidayah-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan SKRIPSI ini yang berjudul **“Pengaruh Pemberian Salep Ekstrak Daun Sirih Hijau (*Piper betle*) terhadap Jumlah SOD dan NRF2 pada Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) Model Luka Insisi yang Diinfeksi *Staphylococcus aureus* (MRSA)”**. Sholawat dan salam semoga tetap tercurah kepada Nabi Agung Muhammad SAW.

Selama penelitian dan penyusunan skripsi ini, halangan dan rintangan terus menerus terjadi pada diri penulis, sehingga dalam penulisannya melibatkan banyak pihak. Oleh karena itu penulis menyampaikan terimakasih dan penghargaan setinggi-tingginya kepada:

1. Allah SWT karena atas limpahan rahmat dan hidayahnya penulis diberikan kesehatan secara fisik dan mental dalam menulis proposal PKL ini dan nantinya akan dapat melaksanakan Praktek Kerja Lapangan dengan baik.
2. Prof. Dr. Aulanni'am, drh., DES selaku pembimbing I dan drh. Dian Vidiastuti, M.Si selaku pembimbing II yang telah banyak memberikan bimbingan, nasehat dan arahan kepada penulis.
3. drh. Arfan Lesmana, M.Sc dan drh. Galuh Chandra Agustina, M, Si selaku dosen penguji atas tanggapan dan saran yang diberikan.

4. Prof. Dr. Aulanni'am, drh., DES selaku Dekan Fakultas Kedokteran Hewan yang selalu memberikan dukungan tiada henti demi kemajuan FKH UB tercinta.
5. Orang tua yang saya cintai, Ibu Rochmani Rufaida dan Alm. Bapak Hadi Wibowo yang begitu ikhlas menyayangi, memberikan semangat, doa dan dukungan yang tak terhingga kepada penulis selama menempuh kuliah di Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya Malang
6. Sahabat dalam penelitian skripsi Athifah Royani M., Desrizal Wildan A. dan Duanti R. F. teman seperjuangan melaksanakan penelitian atas segala dukungan, semangat dan motivasi.
7. Kepada teman-teman 'A'maze dan Avenger angkatan 2014 yang telah memberikan dukungan dan semangat yang tiada hentinya.
8. Kepada Athifah Royani yang senantiasa memberikan motivasi untuk segera menyelesaikan penelitian ini.
9. Kepada Yunus Kholis Romadhon dan Akhmad Ibnu Hidja yang telah memberikan doa, motivasi dan dukungannya kepada penulis sehingga penulis dapat menyelesaikan tugas akhir ini.

Akhirnya hanya kepada Allah SWT kita kembalikan semua urusan dan semoga skripsi ini dapat bermanfaat bagi semua pihak, khususnya bagi penulis dan para pembaca pada umumnya, semoga Allah SWT meridhoi dan dicatat sebagai ibadah disisi-Nya, Amin.

Malang, 6 Juli 2018

Aulia Rahadian
NIM. 145130107111004

**PENGARUH PEMBERIAN SALEP DAUN SIRIH HIJAU (*Piper betle*)
TERHADAP TOTAL SOD DAN JUMLAH NrF2 PADA TIKUS
(*Rattus norvegicus*) MODEL LUKA INSISI YANG
DIINFEKSI DENGAN *Methicillin-Resistance*
Staphylococcus aureus (MRSA)**

ABSTRAK

Luka insisi yang dibuat secara non aseptis akan menimbulkan infeksi. Mikroorganisme yang menyebabkan infeksi pada luka insisi dengan angka kejadian tinggi adalah *Staphylococcus aureus* jenis *Multi-Resistance Staphylococcus aureus* (MRSA). MRSA memiliki kemampuan resistensi terhadap obat-obatan, sehingga dibutuhkan obat herbal yang bertujuan mempercepat kesembuhan luka insisi yang diinfeksi MRSA. Penelitian ini dilakukan dengan tujuan untuk mengetahui pengaruh terapi salep ekstrak daun sirih hijau (*Piper betle*) terhadap jumlah sel kulit yang menghasilkan SOD dan NrF2 pada tikus putih (*Rattus norvegicus*) model luka insisi yang diinfeksi *S.aureus*. Ekstrak daun sirih hijau (*Piper betle*) dipilih karena bersifat antioksidan, antibakteri dan anti-inflamasi. Hewan coba penelitian ini adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur wistar dengan berat badan 150 gram dan umur 8 minggu. Hewan coba dibagi dalam 5 kelompok yaitu kontrol negatif adalah tikus putih diinsisi secara aseptis dengan terapi standar luka, kontrol positif adalah tikus putih yang diinsisi pada bagian punggung dan diinfeksi MRSA dengan konsentrasi 10^5 CFU/mL dengan terapi plasebo. Perlakuan 1, 2 dan 3 adalah tikus putih yang diinsisi pada bagian punggung dan diinfeksi MRSA dengan konsentrasi 10^5 CFU/mL dan diterapi dengan salep berkonsentrasi 2,5%, 5% dan 7,5%. Jumlah SOD dan NrF2 diukur dengan menggunakan metode *Flowcytometry*. Analisa data dilakukan dengan uji *one way ANOVA* dan uji lanjutan BNJ dengan tingkat kepercayaan 95% ($\alpha = 0.05$). Hasil penelitian menunjukkan bahwa pemberian salep daun sirih hijau (*Piper betle*) mampu meningkatkan jumlah SOD dan NrF2. Kesimpulan dari penelitian ini salep daun sirih hijau (*Piper betle*) dapat digunakan sebagai alternatif pengobatan luka insisi yang terinfeksi MRSA.

Kata kunci: Luka insisi, *Staphylococcus aureus*, *Piper betle*, SOD, NrF2

***Piper betle* LEAVES EXTRACT OINTMENT THERAPY TOWARD
SUPEROXIDE DISMUTASE (SOD) AND NRF2 EXPRESSION
IN RATS WITH INCISION WOUND INFECTED
BY METHICILLIN-RESISTANT
Staphylococcus aureus (MRSA)**

ABSTRACT

Wound is defined to losing of continuity because of obstruction in a tissue. Wound cause a disturbance of physiological process in a normal body. Incision wound is one of the open wound that happen in skin tissue. Incision wound which is made without aseptic procedures will cause an infection to the wound. Microorganism that cause an infection with high morbidity numbers are *Staphylococcus aureus*. Multi-Resistance *Staphylococcus aureus* (MRSA) is specific type of *Staphylococcus aureus* which cause infection of incision wound. MRSA has an ability of drug resistance, so there must be a potential alternative drug to against the microorganism. The purpose of this research in order to study the ointment effect of *Piper betle* leaf extract to number of SOD and NrF2 in incision wound model with MRSA infection of white rats (*Rattus norvegicus*). *Piper betle* leaf extract was chosen because it contains antimicrobial activity, antioxidant activity and anti-inflammatory activity. Laboratory animals that used in this experimental study are male whistar strain white rats which have 150 grams weight and 8 weeks old. Experimental animal divided into five groups, negative control was rat with incision wound without infected by MRSA and treated by wound standart therapy, positive control was rat with infected incision wound and treated by placebo ointment, group 1, 2 and 3 were rat with infected incision wound and treated by *Piper betle* leaf extract ointment topically with concentration 2,5%, 5% and 7,5%. Number of SOD and NrF2 was measured by flowcytometry method. Data analysis was performed using one way ANOVA test with 95% confidence ($\alpha = 0.05$). The result showed that *Piper betle* leaf extract ointment increase the level of SOD and Nrf2. The conclusion of this research is *Piper betle* leaf extract ointment is able to use as alternative therapy of incision wound that infected by MRSA.

Keywords: Incision Wound, *Staphylococcus aureus*, *Piper betle*, SOD, NrF2

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	ii
LEMBAR PENGESAHAN	iii
LEMBAR PERNYATAAN	iv
ABSTRAK	v
ABSTRACT	vi
KATA PENGANTAR.....	vii
DAFTAR ISI.....	ix
DAFTAR GAMBAR.....	xi
DAFTAR TABEL.....	xii
DAFTAR LAMPIRAN	xiii
DAFTAR SINGKATAN.....	xiv
BAB I PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	4
1.3 Batasan Masalah.....	4
1.4 Tujuan Penelitian.....	5
1.5 Manfaat Penelitian.....	5
BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....	7
2.1 Luka	7
2.2 Struktur Lapisan Kulit	9
2.3 ROS (Reactive Oxygen Species)	12
2.4 SOD (Superoxide Dimutase)	14
2.5 Nrf2.....	16
2.6 Staphylococcus aureus.....	17
2.7 Daun Sirih Hijau (Piper betle)	19
2.8 Tikus Putih (Rattus norvegicus)	22
BAB III KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN...25	25
3.1 Kerangka Konseptual.....	25
3.2 Hipotesis Penelitian	29
BAB IV METODE PENELITIAN	30
4.1 Tempat dan Waktu Penelitian.....	30
4.2 Alat dan Bahan	30
4.3 Tahapan Penelitian.....	31
4.3.1 Rancangan Penelitian dan Persiapan Hewan coba	31
4.3.2 Penetapan Sampel Penelitian.....	32
4.3.3 Variabel Penelitian	33
4.4 Prosedur Kerja	33
4.4.1 Persiapan Hewan Coba.....	33
4.4.2 Pembuatan Ekstrak Daun Sirih Hijau (Piper betle)	34
4.4.3 Pembuatan Salep Ekstrak Daun Sirih Hijau (Piper betle).....	35
4.4.4 Pembuatan Suspensi Bakteri	36
4.4.5 Pembuatan Luka Infeksi pada Tikus	37
4.4.6 Terapi Salep Ekstrak Daun Sirih Hijau (Piper betle)	38

4.4.7 Pengambilan Jaringan Kulit	38
4.4.8 Pengujian Total Enzim Superoxyde Dismutase (SOD) dan Nrf2	39
4.4.9 Analisis Data	40
BAB V HASIL DAN PEMBAHASAN	41
5.1 Identifikasi Bakteri Staphylococcus aureus.....	41
5.2 Pengamatan Makroskopis Pemberian Salep Ekstrak Daun Sirih Hijau pada Tikus Putih Model Luka Insisi yang Diinfeksi Staphylococcus aureus.....	44
5.3 Pengaruh Pemberian Salep Ekstrak Daun Sirih Hijau Terhadap Jumlah SOD pada Tikus Putih Model Luka Insisi yang Diinfeksi Staphylococcus aureus.....	46
5.4 Pengaruh Pemberian Salep Ekstrak Daun Sirih Hijau Terhadap Jumlah Nrf2 pada Tikus Putih Model Luka Insisi yang Diinfeksi Staphylococcus aureus.....	49
BAB VI KESIMPULAN DAN SARAN.....	53
6.1 Kesimpulan	53
6.2 Saran	53
DAFTAR PUSTAKA	54
LAMPIRAN.....	60



DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.2 Struktur Kulit.....	10
Gambar 2.7 Daun Sirih Hijau.....	20
Gambar 2.8 Tikus Putih.....	22
Gambar 5.1 Uji Morfologi Bakteri pada Media NAP.....	41
Gambar 5.2 Pewarnaan Gram Bakteri <i>Staphylococcus aureus</i>	42
Gambar 5.3 Uji Kemurnian Bakteri <i>Staphylococcus aureus</i>	43
Gambar 5.4 Uji Resistensi Antibiotik.....	44
Gambar 5.5 Gambaran Makroskopis Pasca Insisi.....	45



DAFTAR TABEL

Tabel 5.1 Perhitungan Rata-rata Jumlah SOD.....	46
Tabel 5.2 Perhitungan Rata-rata Jumlah Nrf2.....	49



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Kerangka Operasional Penelitian.....	61
Lampiran 2. Langkah Kerja Penelitian.....	62
Lampiran 3. Identifikasi Bakteri <i>Staphylococcus aureus</i>	68
Lampiran 4. Uji Resistensi Antibiotik pada Bakteri <i>Staphylococcus aureus</i>	69
Lampiran 5. Perhitungan Salep Ekstrak Daun Sirih Hijau.....	70
Lampiran 6. Perhitungan Pengenceran Mc. Farland	71
Lampiran 7. Hasil Uji <i>Flowcytometry</i> terhadap SOD	72
Lampiran 8. Hasil Uji <i>Flowcytometry</i> terhadap Nrf2.....	74
Lampiran 9. Perhitungan Statistika Jumlah SOD	76
Lampiran 10. Perhitungan Statistika Jumlah Nrf2	78
Lampiran 11. Persentase Peningkatan dan Penurunan Jumlah Sel Kulit yang Memproduksi SOD dan NrF2	80
Lampiran 11. Laik Etik	86



DAFTAR SINGKATAN

μL	: Mikroliter
ANOVA	: <i>Analysis of Variance</i>
ARE	: <i>Antioxidants Response Element</i>
BNJ	: <i>Beda Nyata Jujur</i>
BPM	: <i>Beat per Minutes</i>
CFU	: <i>Colony Forming Unit</i>
DNA	: <i>Deoxyribo Nucleic Acid</i>
FGF	: <i>Fibroblast Growth Factor</i>
HCl	: <i>Hydrogen Chloride (Asam Klorida)</i>
Keap1	: <i>Kelch-like ECH Protein 1</i>
kg	: Kilogram
KGF	: <i>Keratinocyte Growth Factor</i>
MDA	: <i>Malondialdehyde</i>
mg	: Miligram
mL	: Mililiter
MMP	: <i>Matrix Metalloproteinase</i>
MRSA	: <i>Methicillin-Resistance Staphylococcus aureus</i>
NADPH	: <i>Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate Hidrogenase</i>
NB	: <i>Nutrient Broth</i>
Nrf2	: <i>Nuclear factor-erythroid related factor 2</i>
°C	: Derajat Celcius
pH	: <i>Potential Hydrogen</i>
RAL	: <i>Rancangan Acak Lengkap</i>
ROS	: <i>Reactive Oxygen Species</i>
sMaf	: <i>Small Musculoapoptotic Fibroblast</i>
SOD	: <i>Superoxide Dismutase</i>
SSIs	: <i>Surgical Site Infections</i>
MDR	: <i>Multi Drug Resistance</i>
MAPK	: <i>Mitogen Activated Protein Kinase</i>
PKC	: <i>Protein Kinase C</i>
PBS	: <i>Phosphate Buffer Saline</i>
MHA	: <i>Muller-Hinton Agar</i>
MSA	: <i>Mannitol Salt Agar</i>
NAP	: <i>Nutrient Agar Plate</i>
TGFβ	: <i>Transforming Growth Factor Beta</i>

BAB I PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Luka adalah rusaknya atau hilangnya jaringan tubuh yang terjadi akibat adanya suatu gangguan sistem pertahanan tubuh. Luka dapat disebabkan oleh berbagai macam faktor yaitu akibat adanya trauma, luka akibat insisi saat operasi, gigitan atau cakaran hewan dan luka akibat terkena zat kimia yang bersifat korosif. Luka memberikan angka morbiditas yang cukup besar di dunia, terutama luka kronis karena mengganggu fungsionalitas jaringan dan perubahan nilai estetikanya. Timbulnya luka akan menyebabkan terjadinya gangguan fisiologis pada organ yang terkena luka. Luka yang timbul akan memunculkan efek berupa hilangnya sebagian atau seluruh fungsi organ, respon stress simpatis, perdarahan dan pembekuan darah, kontaminasi bakteri dan kematian sel. Maka dari itu diperlukan penanganan luka yang tepat untuk mengembalikan fungsionalitas sel (Baroroh, 2011; Leong *et al*, 2012).

Luka terbagi atas dua jenis yaitu luka terbuka dan luka tertutup. Luka terbuka merupakan luka yang menyebabkan terjadinya perdarahan dan menimbulkan kontak langsung antara jaringan dibawah kulit dan lingkungan luar sehingga menimbulkan kontaminasi dengan kuman dan radikal bebas. Radikal bebas umum merupakan atom yang tidak berpasangan yang sangat reaktif untuk mengikat atom lain yang tidak berpasangan. Radikal bebas yang berbasis atom oksigen disebut ROS (*Reactive Oxygen Species*). Kadar ROS yang berlebihan dalam tubuh mengakibatkan stress oksidatif sehingga menghambat proses kesembuhan luka (Danususanto, 2007).

Pasien yang melakukan operasi pembedahan mengalami infeksi sekitar 20 persen pada saat pelaksanaan operasi. Bakteri *Staphylococcus aureus* strain MRSA (*Methicillin-Resistance Staphylococcus aureus*) merupakan salah satu penyebab infeksi. Infeksi tersebut dapat menjalar secara sistemik atau terlokalisasi akibat dari agen infeksi atau toksin dari agen infeksi seperti MRSA. Penggunaan obat dalam rangka penanganan luka bertujuan untuk mempercepat proses kesembuhan luka. Obat yang dapat digunakan dapat berupa obat kimia maupun obat – obatan herbal alami yang dibuat secara tradisional baik dari tanaman maupun rempah – rempah. Indonesia memiliki sekitar 30.000 jenis tanaman dan 6000 diantaranya berpotensi untuk menjadi tanaman obat (Kurdi, 2011; Almaida *et al*, 2012).

Penggunaan obat luka kimiawi seperti povidone iodine dalam jangka waktu yang lama dapat menyebabkan rasa perih pada kulit, iritasi kulit dan kulit jadi terwarnai kuning akibat warna dasar dari povidone iodine (Sibbald *et al.*, 2011). Pengobatan menggunakan bahan – bahan herbal dilakukan untuk menekan adanya efek samping yang akan ditimbulkan dari suatu bahan kimia (Maroon *et al.*, 2010).

Daun Sirih Hijau (*Piper betle*) merupakan tanaman yang berasal dari beberapa daerah di Indonesia dan banyak ditemukan di Pulau Jawa. Tanaman ini biasanya digunakan sebagai pembersih gigi dan penghilang bau mulut oleh masyarakat Indonesia. Daun Sirih Hijau memiliki beberapa kandungan zat kimia berupa minyak atsiri, flavonoid, tannin dan alkaloid. Minyak atsiri memiliki efek sebagai anti mikroba, analgesik dan merangsang fagositosis. Flavonoid dan tannin

merupakan bahan aktif sebagai anti inflamasi dan anti mikroba. Flavonoid sendiri merupakan senyawa polifenol yang dapat menimbulkan efek seperti antitumor dan anti oksidan (Pradhan *et al.*, 2013).

SOD merupakan enzim yang akan berikatan dengan radikal bebas sehingga mencegah radikal bebas untuk berikatan dengan molekul-molekul penting dalam tubuh dan menimbulkan malfungsi dari kinerja molekul tersebut (Christiana *et al.*, 2014). Proses kesembuhan luka dapat berjalan dengan baik dengan memperkecil radikal bebas yang dihasilkan dari proses metabolisme tubuh (endogen) maupun dari luar tubuh (eksogen). Infeksi dari MRSA menyebabkan inflamasi kronis yang menambah jumlah radikal bebas berbasis atom oksigen *Reactive Oxygen Species* (ROS). *Nuclear factor 2 – erythroid related factor 2* (Nrf2) merupakan protein yang berperan dalam sintesis antioksidan dalam tubuh seperti SOD, Heme-oksigenase, Glutathione Peroksidase dan lain sebagainya. Nrf2 akan bekerja pada kondisi inflamasi kronis untuk menghasilkan antioksidan yang dapat menghilangkan radikal bebas dengan mensintesis antioksidan dalam tubuh, sehingga proses inflamasi kronis akan cepat berlanjut pada fase proliferasi (Diez *et al.*, 2015).

Penelitian obat alternatif menggunakan bahan alam diperlukan untuk membantu proses regenerasi sel, anti-inflamasi dan anti-oksidatif dengan mengukur jumlah SOD sebagai antioksidan dan jumlah Nrf2 kulit sebagai indikator radikal bebas terhadap kesembuhan luka dengan terapi salep ekstrak Daun Sirih Hijau (*Piper betle*). Salep dari ekstrak Daun Sirih Hijau (*Piper betle*)

diharapkan meningkatkan SOD dan meningkatkan jumlah Nrf2 pada luka insisi tikus putih (*Rattus norvegicus*) yang diinfeksi bakteri *Staphylococcus aureus*.

1.2 Rumusan Masalah

1. Apakah pemberian salep ekstrak Daun Sirih Hijau (*Piper betle*) secara topikal mampu meningkatkan kadar SOD (*Superoxide Dismutase*) berkaitan dengan penyembuhan luka insisi pada tikus (*Rattus norvegicus*) yang diinfeksi bakteri *Staphylococcus aureus*?
2. Apakah pemberian salep ekstrak Daun Sirih Hijau (*Piper betle*) secara topikal mampu meningkatkan jumlah Nrf2 berkaitan dengan penyembuhan luka insisi pada tikus (*Rattus norvegicus*) yang diinfeksi bakteri *Staphylococcus aureus*?

1.3 Batasan Masalah

1. Hewan model yang digunakan adalah tikus (*Rattus norvegicus*) jantan strain *wistar* umur 8-12 minggu dengan berat badan berkisar antara 150-180 gram. Penggunaan hewan coba dalam penelitian ini sedang diajukan untuk mendapatkan sertifikat laik etik dari Komisi Etik Penelitian Universitas Brawijaya Malang.
2. Luka insisi dibuat dengan menginsisi pada daerah punggung sepanjang 4 cm hingga kedalaman 1,5 mm pada subkutan dengan menggunakan *scalpel-blade*.
3. Luka insisi diinfeksi menggunakan bakteri *Staphylococcus aureus* strain MRSA (Metichillin-Resistant *Staphylococcus aureus*) 10^5 CFU/mL saat pelaksanaan pembuatan luka insisi.

4. Pemberian salep ekstrak Daun Sirih Hijau (*Piper betle*) dilakukan secara topikal dengan konsentrasi berbeda yaitu 2,5%, 5,0% dan 7,5% dengan frekuensi pemberian dua kali sehari selama 7 hari pasca perlakuan.
5. Variabel yang diamati dalam penelitian ini adalah kadar SOD (*Superoxide Dismutase*) dan Nrf2 pada serum hasil gerusan spesimen kulit menggunakan flowsitofotometri.
6. SOD diukur berdasarkan jumlah sel kulit yang mengekspresikan SOD menggunakan *flowcytometer*.
7. Nrf2 diukur berdasarkan jumlah sel kulit yang mengekspresikan Nrf2 menggunakan *flowcytometer*.

1.4 Tujuan Penelitian

1. Mengetahui efek pemberian salep ekstrak Daun Sirih Hijau (*Piper betle*) secara topikal mampu meningkatkan kadar SOD (*Superoxide Dismutase*) berkaitan dengan penyembuhan luka insisi pada tikus (*Rattus norvegicus*) yang diinfeksi bakteri *Staphylococcus aureus*.
2. Mengetahui efek pemberian salep ekstrak Daun Sirih Hijau (*Piper betle*) secara topikal mampu meningkatkan jumlah Nrf2 berkaitan dengan penyembuhan luka insisi pada tikus (*Rattus norvegicus*) yang diinfeksi bakteri *Staphylococcus aureus*.

1.5 Manfaat Penelitian

Beberapa manfaat dalam penelitian ini yaitu sebagai bahan informasi penelitian selanjutnya untuk membuktikan pengaruh pemberian salep ekstrak Daun Sirih Hijau (*Piper betle*) sebagai terapi luka insisi pada tikus (*Rattus*

norvegicus) yang diinfeksi bakteri *Staphylococcus aureus* ditinjau dari kadar SOD (*Superoxide Dismutase*) dan Nrf2. Pemanfaatan pemberian salep ekstrak Daun Sirih Hijau (*Piper betle*) diharapkan dapat digunakan sebagai terapi penyembuhan luka insisi yang bersifat anti inflamasi dan mempercepat regenerasi sel sehingga dapat mengurangi penggunaan obat kimia yang berpotensi menimbulkan iritasi, bengkak maupun kemerahan pada kulit.



BAB II TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Luka

Luka merupakan rusaknya atau hilangnya jaringan tubuh yang disebabkan adanya suatu faktor yang mengganggu sistem perlindungan tubuh. Beberapa faktor yang menyebabkan luka yaitu trauma, perubahan suhu yang ekstrim, reaksi dengan zat kimia, terkena sengatan listrik, ledakan ataupun gigitan hewan. Berdasarkan kontak dengan lingkungannya, luka dibedakan menjadi luka terbuka dan tertutup. Luka terbuka merupakan luka yang membuat bagian dalam jaringan tubuh mengalami kontak langsung dengan lingkungan. Salah satu contoh luka terbuka adalah luka insisi yang merupakan luka robekan linier yang teratur pada jaringan kulit. Luka tertutup merupakan luka yang terletak di dalam suatu jaringan dan tidak mengakibatkan kontak dengan lingkungan diluar tubuh. Salah satu contoh luka tertutup adalah hematoma dimana luka akibat pecahnya pembuluh darah sehingga darah terakumulasi dibawah jaringan kulit (Leong *et al*, 2012).

Menurut Leong *et al*. (2012), terdapat beberapa fase penyembuhan luka yaitu awal, fase tengah dan fase akhir. Masing-masing fase memiliki proses fisiologis dan peranan sel yang berbeda. Fase awal merupakan fase hemostasis dimana pembuluh darah yang terputus akan dihentikan dengan cara vasokonstriksi pembuluh darah. Fase awal juga terjadi proses inflamasi untuk membuang jaringan yang rusak serta jaringan yang terinfeksi. Fase pertengahan merupakan fase dimana terjadi proliferasi sel mesenkim, epitelisasi dan angiogenesis. Sintesis kolagen juga terjadi pada fase pertengahan. Fase akhir pada proses penyembuhan luka terjadi *remodeling*.

Luka yang terjadi hingga menyebabkan kerusakan pada epidermis berakibat pada rusaknya pembuluh darah sehingga terjadi pendarahan. Keadaan tersebut akan memicu proses fisiologis tubuh berupa homeostasis. Proses homeostasis ini memerlukan peranan platelet dan fibrin untuk melakukan pembekuan darah. Pecahnya pembuluh darah memicu proses pembekuan yang dimulai dari rangsangan kolagen terhadap platelet. Platelet akan menempel pada platelet lainnya yang dimediasi oleh protein fibrinogen dan vaktor Von Willebrand. Agregasi platelet bersama dengan eritrosit akan menutup kapiler untuk menghentikan pendarahan (Fowler *et al.*, 2008).

Fase penyembuhan luka berikutnya adalah fase inflamasi. Fase inflamasi merupakan respon fisiologis tubuh dalam menangani luka dan infeksi. Inflamasi ditandai dengan adanya kemerahan pada kulit, pembengkakan, peningkatan suhu tubuh, nyeri dan gangguan fungsi organ. Tujuan dari reaksi inflamasi adalah membunuh mikro organisme yang mengkontaminasi luka. Peningkatan suhu tubuh dan kemerahan pada kulit disebabkan karena adanya vasokonstriksi lokal pada pembuluh darah sehingga pendarahan akan terhenti. Proses ini dimediasi oleh eponenrin, prostaglandin dan norepineprin. Vasokonstriksi ini berlangsung antara 10 – 15 menit yang selanjutnya diikuti vasodilatasi pembuluh darah yang dimediasi serotonin, histamine dan kinin (Fowler *et al.*, 2008).

Fase inflamasi menyebabkan leukosit melakukan diapedesis yaitu berpindah menuju ke jaringan yang luka. Tipe leukosit yang berada pada luka pada dua hari pertama adalah neutrophil yang berfungsi melakukan fagositosis. Neutrophil yang telah melakukan fagositosis akan dinonaktivasi oleh makrofag. Makrofag merupakan penghasil sitokin dan *growth factor* yang menstimulasi proliferasi fibroblast, produksi

kolagen, pembentukan pembuluh darah baru, dan proses penyembuhan lainnya. Limfosit T akan muncul pada hari ke lima kelukaan dan menghasilkan sitokin (Fowler *et al.*, 2008).

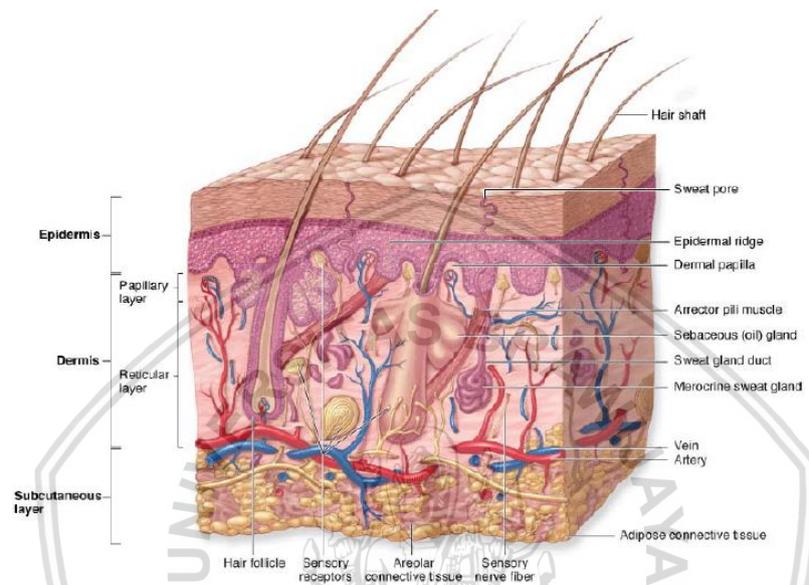
Fase berikutnya adalah fase proliferasi. Fase proliferasi ini terjadi penurunan jumlah sel inflamasi, munculnya sel fibroblast yang berproliferasi, pembentukan pembuluh darah yang rusak dan epitelisasi luka. Matriks fibrin yang dipenuhi platelet dan makrofag mengeluarkan *growth factor* yang mengaktifasi fibroblast. Fibroblast selanjutnya bermigrasi ke daerah luka selanjutnya berproliferasi pada hari ke tiga sampai ke lima. Angiogenesis merupakan pembentukan pembuluh darah baru yang dirangsang untuk proliferasi sel. Pembuluh darah baru diperlukan untuk mengatur vaskularisasi yang rusak akibat luka (Pavletic, 2010).

Fase penyembuhan luka yang terakhir adalah fase *remodeling*. Fase ini merupakan fase terlama dari fase penyembuhan luka yang lain. Proses *remodeling* dimulai ketika kolagen mulai menurun dan stabil. Proses ini didasari oleh peningkatan kekuatan sel pengganti dari jaringan yang rusak secara signifikan. Fase ini dimulai pada hari ke-21 pasca terjadinya luka hingga satu tahun (Pavletic, 2010).

2.2 Struktur Lapisan Kulit

Kulit merupakan organ yang tersusun atas empat jaringan dasar yaitu: (1) epitel skuamus simpleks dengan kornifikasi, (2) jaringan ikat seperti kolagen dan elastin, (3) jaringan otot dan (4) jaringan saraf. Secara umum, struktur kulit terdiri atas dua lapisan utama yaitu epidermis dan dermis (**Gambar 2.2**). Epidermis merupakan jaringan-jaringan epitel yang berasal dari ektodermis, sedangkan dermis merupakan jaringan ikat yang berasal dari mesodermis. Hipodermis

merupakan jaringan yang terletak dibawah dermis dan merupakan jaringan ikat longgar. Lapisan hypodermis terdiri dari jaringan lemak (Gibson, 2007).



Gambar 2.2 Struktur Lapisan Kulit (Kalangi, 2013).

Lapisan epidermis tersusun atas lapisan epitel dan tidak memiliki pembuluh darah maupun limfonodul. Lapisan epidermis memperoleh nutrisi dan oksigen melalui kapiler darah yang berada pada lapisan dermis. Epitel skuamus simpleks ini memiliki keratin yang dibentuk oleh keratinosit. Sel keratinosit ini secara terus menerus diperbarui dengan cara mitosis sel sehingga stratum basalis berangsur tergeser ke permukaan epitel. Keratinosit terus berdiferensiasi, membesar dan mengumpulkan filament keratin dalam sitoplasmanya. Waktu yang dibutuhkan dalam mencapai lapisan terluar adalah 20 – 30 hari (Gibson, 2007).

Epidermis terdiri dari lima lapisan berturut-turut dari dalam keluar adalah stratum basalis, stratum spinosum, stratum granulosum, stratum lusidum dan stratum korneum. Stratum basalis terletak paling dalam dan tersusun atas epitel kuboid dan menyatu pada lapisan dermis dibawahnya. Sel kuboid ini memiliki inti yang besar dan sitoplasmanya basofilik. Lapisan ini terlihat gambaran mitotic sel dan proliferasi sel untuk regenerasi epitel. Sel ini akan cepat berproliferasi apabila terdapat perlukaan pada kulit (Kalangi, 2013).

Stratum spinosum ini memiliki epitel dengan bentuk polygonal dengan inti lonjong. Sitoplasma dari sel epitel ini berwarna kebiruan. Stratum spinosum ini disebut dengan lapisan taju karena terdapat lapisan seperti taju yang seperti menghubungkan lapisan satu dan lapisan lainnya. Stratum granulosum merupakan lapisan yang terdiri dari dua sampai empat lapis sel epitel skuamus yang banyak mengandung granula basofilik yang disebut granula strato hyaline. Granula ini memiliki mikrofiliamen yang melekat pada permukaan granula (Kalangi, 2013).

Stratum lusidum merupakan lapisan yang terbentuk dari dua sampai tiga lapisan sel epitel skuamus. Sitoplasmanya berwarna eosinofilik. Lapisan ini beebentuk seperti celah sehingga terlihat memisahkan diri dari lapisan diatas dan bawahnya. Stratum korneum memiliki banyak lapisan tanduk atau keratin. Lapisan keratin merupakan kumpulan dari sel-sel yang mati, pipih dan tak berinti. Sel mati yang berada pada permukaan merupakan sel yang selalu terdehidrasi dan mudah terkelupas (Kalangi, 2013).

2.3 ROS (*Reactive Oxygen Species*)

Radikal bebas merupakan molekul yang memiliki dua atau lebih elektron yang tidak berpasangan dalam strukturnya. Elektron yang tidak berpasangan dalam radikal bebas akan berusaha mengikat elektron lain untuk dapat berpasangan sehingga radikal bebas merupakan molekul dengan elektron yang reaktif. Cara radikal bebas untuk berpasangan dengan elektron lain adalah dengan mengikat elektron tersebut secara langsung (proses oksidasi) maupun dengan menerima elektron dari senyawa lain (proses reduksi) (Danasantoso, 2007).

Radikal bebas dapat bermuatan negatif, positif dan netral. Radikal bebas tidak semua mengandung unsur oksigen di dalamnya. Secara biologis, hampir semua radikal bebas merupakan derivat dari atom oksigen seperti anion superoksida, hidrosil dan nitrogen oksida sintase. Radikal bebas yang memiliki basis atom oksigen ini disebut ROS (*Reactive Oxygen Species*). ROS dihasilkan dari beberapa sumber dari dalam tubuh diantaranya adalah saat proses metabolisme aerob pada Siklus Krebs dari glukosa dan metabolisme oksidasi asam lemak. ROS juga dapat dihasilkan dari hasil fagositosis leukosit terhadap bakteri maupun virus. Perubahan asam arakidonat menjadi prostaglandin dan prostasiklin dan proses oksigenasi hemoglobin juga merupakan beberapa proses terbentuknya ROS. Sumber dari lingkungan atau dari luar tubuh yang dapat meningkatkan kadar ROS adalah polusi udara seperti karbon monoksida dan karbon dioksida. Polusi udara akan menyebabkan peningkatan dari ROS yang kemudian secara langsung akan mengakibatkan stres oksidatif pada beberapa organ tubuh terutama paru-paru (Danasantoso, 2007).

Pada kondisi fisiologis ROS merupakan agen dari proses biokimia dalam sel. ROS berperan dalam proses fisiologis dalam jumlah yang sedikit untuk mengatur ekspresi gen, pertumbuhan sel dan agen pertahanan dari infeksi dengan cara aktivasi sinyal transduksi. Fungsi dari ROS yang lain adalah untuk memodulasi reaksi sensitive reduksi dan oksidasi dalam hal *intracellular signaling* yang dibentuk dari NADPH oksidase. Tujuannya adalah menghambat kerja dari protein tyrosin phosphatase dan aktivasi beberapa kanal ion. Contohnya adalah pada sel endotel, agen yang berfungsi untuk melakukan angiotensin disinyalisasi oleh ROS (Bhattacharya, 2015).

ROS dapat bersifat toksik pada sel karena ROS dapat bereaksi dengan makromolekul seperti molekul, lemak dan DNA serta bereaksi dengan ion radikal bebas yang lain. Radikal bebas yang bereaksi dapat membentuk radikal peroksil yang dapat mengganggu proses metabolisme dalam tubuh. ROS dapat menginduksi oksidasi dari protein dan dapat mengakibatkan fragmentasi, agregasi atau reaksi silang dengan protein yang lain. Oksidasi protein menghasilkan aldehid dan keton yang akhirnya protein dapat lebih mudah untuk didegradasi oleh metabolisme sel. Mitokondria dan inti sel mengandung asam lemak yang tidak tersaturasi dengan konsentrasi tinggi pada komponen lemak. Degradasi lengkap dari membran lemak dapat menyebabkan pembentukan lemak hidroperoksida yang dapat dipecah menjadi golongan aldehid seperti malonaldehid dan hidroksinonenal dari siklus hidrokarbon. Sehingga dapat menyebabkan reaksi silang membran protein dan berdampak pada gangguan fungsi sel (Bhattacharya, 2015).

Kelebihan produksi ROS menyebabkan stress oksidatif yang menimbulkan ketidak seimbangan antara manifestasi sistemik ROS dan sistem biologis untuk detoksifikasi radikal bebas dan perbaikan kerusakan sel. Terjadinya peningkatan radikal bebas akan menyebabkan tingginya konsentrasi ROS dan dapat menyebabkan kerusakan pada makromolekul esensial dari sel, abnormalitas ekspresi gen, gangguan imunitas, mutagenesis dan deposisi protein. Hasilnya yaitu terciptanya beberapa penyakit seperti kanker, penyakit gangguan pernapasan, inflamasi, gangguan kardiovaskular, diabetes, infertilitas pada pejalan, proses *aging* dan penyakit saraf (Bhattacharya, 2015).

2.4 SOD (*Superoxide Dismutase*)

SOD atau *Superoxide Dismutase* merupakan suatu enzim yang berfungsi untuk mengkatalisa radikal bebas superoksida menjadi hydrogen peroksida dan oksigen. Terdapat beberapa jenis SOD seperti Copper-Zinc-SOD yang terdapat dalam mitokondria, Ekstra Seluler SOD dan Besi SOD yang hanya ditemukan pada tumbuhan (Camelli *et al.*, 2009).

SOD merupakan antioksidan yang paling kritis yang dapat memperbaiki efek stress oksidatif. Superoksida merupakan suatu radikal bebas yaitu molekul yang memiliki elektron tak berpasangan. Terdapatnya elektron yang tak berpasangan ini menyebabkan molekul superoksida ini sangat reaktif. Enzim SOD bertugas untuk mengkatalisa radikal bebas superoksida menjadi hidrogen peroksida dan oksigen (Nurhayati dkk., 2011).

Pembentukan senyawa superoksida dimulai dari molekul oksigen yang memiliki dua atom oksigen yang tidak berpasangan sehingga menimbulkan

kekuatan untuk berikatan dengan molekul lain. Kemampuan untuk mengait molekul lain ini dapat disebut sifat radikal. Oksigen dalam bentuk ini bersifat reaktif sehingga disebut superoksida. Semua tipe sel dan organela intraseluler dapat membentuk anion superoksida melalui dua mekanisme yaitu reaksi kompleks enzimatik dan jalur kontaminasi bahan radioaktif maupun xenobiotik. Beberapa sumber pembentukan superoksida yaitu rangkaian transport elektron pada mitokondria, sitosol xanthine dan oksidasi xanthin, sintesis grup nitro oksida, kompleks oksidasi NADPH, metabolisme eritrosit dan homosistein (Christiana *et al.*, 2014).

Aktivitas SOD berlangsung dengan cara menghilangkan O_2^- dengan cara mengkatalis dismutasinya. Satu molekul O_2^- akan dioksidasi oleh molekul oksigen dan molekul O_2^- yang lain akan direduksi oleh hidrogen peroksida. Hal tersebut membuktikan bahwa molekul radikal oksigen kehilangan elektronnya dan mendapatkan ekstra elektron dengan *unequal and disproportion way*. Disproporsi dilakukan oleh enzim SOD yang mengandung besi, mangan, tembaga dan seng di dalamnya. Reaksi dismutase superoksida berjalan melalui dua tahap yang disebut reaksi pingpong. Reaksi pingpong berjalan dengan cara ion metal direduksi oleh ion O_2^- yang pertama dimana ion tersebut kehilangan elektron dan terkonversi menjadi molekul oksigen. Reaksi yang pertama ini ion positif dari unsur logam akan mengikat ion dari molekul oksigen. Reaksi ke dua berjalan dengan cara melakukan mutasi dari ion molekul O_2^- yang pertama dengan ion yang kedua dengan cara memberikan suplai proton dari pembentukan H_2O_2 sehingga terjadi reaksi reduksi dari ion kedua (Christiana *et al.*, 2014).

2.5 Nrf2

Nrf2 atau *Nuclear factor-erythroid related factor 2* merupakan suatu protein yang berfungsi sebagai faktor transkripsi sitosol. Nrf2 berfungsi untuk pertahanan biologis terhadap stress oksidatif dan xenobiotik. Mekanisme kerja dari Nrf2 yaitu dengan membentuk berbagai macam antioksidan seperti SOD, Glutathione peroksidase, Heme-oksigenase dan lain sebagainya (Yasuda *et al.*, 2016).

Metabolisme Nrf2 dalam kondisi tidak mengalami stress oksidatif diikat oleh protein Keap1 (Kelch Like ECH protein) untuk menandai Nrf2 menuju degradasi proteasomal. Stress oksidatif menyebabkan Nrf2 melepas ikatan Keap1 dengan reaksi fosforilasi dan melakukan translokasi menuju nucleus. Nrf2 yang masuk ke dalam nucleus akan mengikat ARE (*Antioxidant Response Element*) dan protein sMAF (*Small Musculo Apoptotic Fibroblas*). ARE terletak pada region promotor dari suatu gen yang bertugas mengkode antioksidan dan enzim detoksifikasi. Antioksidan ini berfungsi untuk menghilangkan ROS yang berlebih dalam tubuh (Ambrozova *et al.*, 2017).

Kulit yang terluka menyebabkan terakumulasinya ROS endogen dalam tubuh. ROS yang terakumulasi akan merangsang protein kinase dan menghasilkan reaksi fosforilasi untuk memecah ikatan Keap1 dan Nrf2. Nrf2 yang terpisah menuju ke nucleus dan melakukan ikatan pada ARE yang terletak pada promotor gen dan mengikat sMaf. Gen akan memproduksi antioksidan seperti Heme-oksigenase, Glutathione peroksidase, SOD dan NADPH-oksidade yang akan menurunkan akumulasi ROS dalam tubuh. Produksi antioksidan yang cukup dan jumlah ROS dalam tubuh yang telah menurun akan mensinyalasi protein Keap1

untuk masuk ke dalam nucleus dan mengikat Nrf2 untuk dibawa kembali ke sitosol dan melakukan degradasi (Ambrozova *et al.*, 2017).

Nrf2 diinduksi oleh beberapa zat seperti ROS dan ARE *inducers*. ROS atau radikal bebas yang dapat menginduksi Nrf2 adalah NO, H₂O₂, asam nitro-oleat dan prostaglandin untuk golongan radikal bebas endogen. Radikal bebas eksogen yang dapat menginduksi Nrf2 dapat berasal dari senyawa fitokimia seperti flavonoid, quercetin, sulphanorphan dan curcumin serta golongan obat-obatan yang dapat menginduksi adalah asetaminofen. Induktor yang merangsang bekerjanya Nrf2 yang penting selain ROS adalah KGF (*Keratinocyte Growth Factor*), FGF (*Fibroblast Growth Factor*) dan heme yang merupakan protein darah yang bersifat menstabilisasi Nrf2 (Ambrozova *et al.*, 2017).

2.6 *Staphylococcus aureus*

Secara umum genus *Staphylococcus* merupakan bakteri gram positif dengan diameter 0,5 – 1,5 µm. Genus ini memiliki ciri khas yaitu berbentuk kokus individu ataupun menyerupai anggur yang bergerombol. Genus *Staphylococcus* memiliki 32 spesies dan delapan subspecies. *Staphylococcus* merupakan salah satu genus dengan sifat non motil dan tidak memiliki spora. Genus ini merupakan bakteri fakultatif anaerob yang diikuti dengan respirasi aerob dengan cara fermentasi. Anggota dari genus *Staphylococcus* merupakan bakteri yang menghasilkan enzim katalase positif dan oksidase negative. Dinding sel dari bakteri anggota genus ini memiliki komponen yang berbeda tiap spesiesnya (Harris *et al.*, 2002).

Genus *Staphylococcus* merupakan genus bakteri yang toleran terhadap garam konsentrasi tinggi dan resisten terhadap panas. Pathogenesitas *Staphylococcus* diidentifikasi dari kemampuannya memproduksi enzim koagulase dan membekukan darah. Enzim koagulase yang dihasilkan bakteri genus *Staphylococcus* terbagi atas dua jenis yaitu katalase positif dan negatif. Katalase positif dihasilkan oleh spesies *S. aureus*, *S. intermedius* dan *S. hycus* serta katalase negatif dihasilkan oleh spesies *S. epidermidis*. *S. aureus* memproduksi berbagai macam toksin dan enzim yang menyebabkan faktor virulensi. Toksin dan enzim yang diproduksi oleh *S. aureus* adalah katalase, koagulase, hyaluronidase dan beta lactamase (Harris *et al.*, 2002).

Bakteri *S.aureus* dalam dunia medis sering menyebabkan beberapa masalah salah satunya yaitu menyebabkan infeksi pada saat pelaksanaan pembedahan. Kejadian infeksi bakteri *S.aureus* saat pelaksanaan pembedahan disebut dengan *Surgical Site Infections* (SSIs). Penyebab kejadian infeksi saat pelaksanaan pembedahan oleh *S.aureus* disebabkan oleh beberapa faktor yaitu pre-operatif, lingkungan dilaksanakannya pembedahan dan manajemen post-operatif. Bakteri *S.aureus* dapat menuju target infeksi dengan transmisi dengan cara melalui orang ke orang, menempel dengan peralatan bedah dan melalui udara hingga menuju ke target infeksi. Strain bakteri *S.aureus* yang berperan dalam melakukan infeksi saat prosedur pembedahan adalah MRSA (*Metichillin-Resistant Staphylococcus aureus*) (Naik, 2011).

Salah satu jenis dari bakteri *Staphylococcus aureus* yang menyebabkan *Surgical Site Infections* (SSIs) adalah *Metichillin-Resistance Staphylococcus*

aureus. Mekanisme resistensi bakteri *Staphylococcus aureus* dimulai dari antibiotik yang mengalami penurunan aktivitas sehingga tidak sesuai seperti standar suatu golongan antibiotik. Bakteri yang terus terpapar antibiotik yang mengalami penurunan kerja selanjutnya akan menjadi resisten dengan antibiotik yang dipaparkan sehingga bakteri akan menjadi resisten. Resistensi terhadap senyawa beta laktam yang tidak terhidrolisa oleh enzim beta lactamase seperti metichillin, oxacillin, nafsillin dan cloxacillin disebut sebagai resistensi intrinsik atau resistensi methicillin. MRSA (*Methicillin-Resistance Staphylococcus aureus*) merupakan jenis bakteri yang mengalami resistensi antibiotik golongan penicillin dan cephalosporin (Haddadin *et al.*, 2002). Menurut Dal *et al.* (2011), infeksi MRSA dilakukan dengan pembuatan suspense bakteri sesuai dengan standart Mc Farland dengan dosis 100 μ l yang dicampurkan dengan pasir steril dan ditaburkan pada luka insisi.

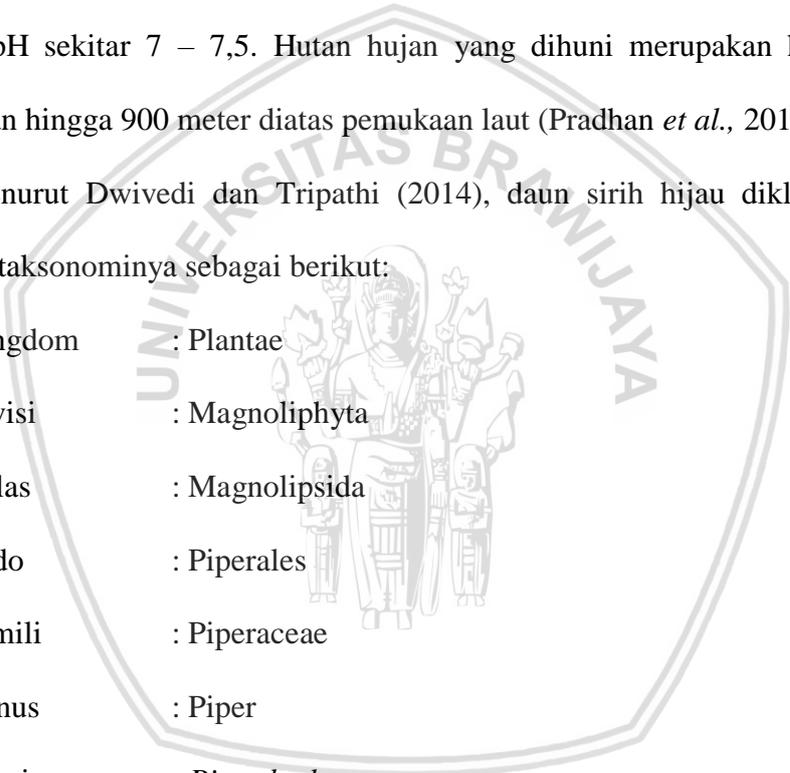
2.7 Daun Sirih Hijau (*Piper betle*)



Gambar 2.7 Daun Sirih Hijau (Dwivedi dan Tripathi, 2014)

Daun Sirih Hijau (*Piper betle*) merupakan tumbuhan yang dapat hidup di daerah tropis dan banyak ditemukan di kawasan Asia Tenggara khususnya Indonesia (**Gambar 2.7**). Daun Sirih Hijau (*Piper betle*) digunakan secara tradisional oleh masyarakat Asia Tenggara sebagai obat pembersih mulut dengan cara dikunyah. Tumbuhan ini hidup di daerah hutan dengan kadar kelembaban tinggi. Tanah tempat tumbuh sirih hijau mengandung masa organik yang tinggi dengan pH sekitar 7 – 7,5. Hutan hujan yang dihuni merupakan hutan hujan ketinggian hingga 900 meter diatas permukaan laut (Pradhan *et al.*, 2013).

Menurut Dwivedi dan Tripathi (2014), daun sirih hijau diklasifikasikan menurut taksonominya sebagai berikut:



Kingdom	: Plantae
Divisi	: Magnoliphyta
Kelas	: Magnolipsida
Ordo	: Piperales
Famili	: Piperaceae
Genus	: Piper
Species	: <i>Piper betle</i>

Daun Sirih Hijau (*Piper betle*) memiliki beberapa kandungan kimia seperti alkaloids, tannins, karbohidrat, asam amino dan komponen steroid. Daun Sirih Hijau juga mengandung senyawa berupa minyak yang mengandung dua gugus fenolik yaitu Chavibetol dan Chavicol. Daun Sirih Hijau (*Piper betle*) memiliki aktivitas senyawa yang dapat digunakan sebagai antimikroba. Aktivitas senyawa ini bersifat *broad spectrum* terhadap bakteri *Staphylococcus aureus*, *Proteus*

vulgaris, *Eschericia coli* dan *Pseudomonas sp.* Senyawa bioaktif tersebut merupakan senyawa sterol yang didapatkan dari ekstrak kasar maupun ekstraksi yang hanya mengambil senyawa spesifik sterol (Pradhan *et al.*, 2013).

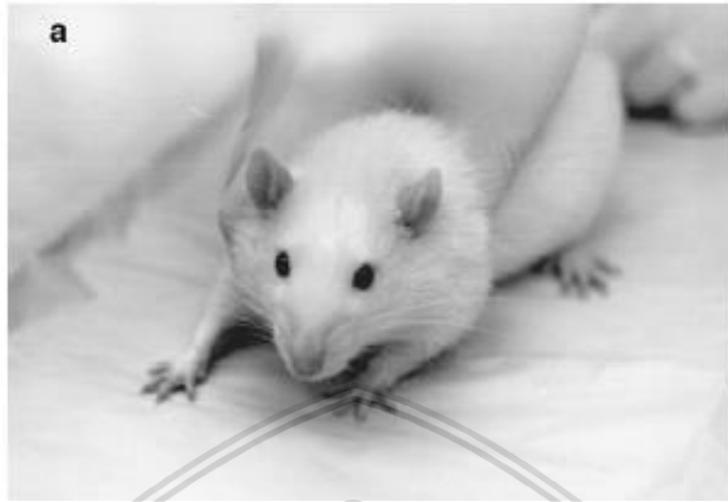
Daun Sirih Hijau (*Piper betle*) memiliki efek sebagai antioksidan dan anti inflamasi. Antioksidan dan anti inflamasi dihasilkan dari beberapa senyawa yaitu eugenol, allylpyrocatechol dan quercetin. Eugenol merupakan senyawa yang didapatkan dari daun pada tumbuhan sirih. Senyawa ini memiliki aktivitas anti inflamasi, antioksidan dan analgesik. Allylpyrocatechol merupakan senyawa fenolik yang berasal dari daun tumbuhan sirih. Aktivitas senyawa ini adalah melawan bakteri obligat anaerob dan berperan sebagai senyawa antioksidan. Senyawa quercetin merupakan senyawa golongan flavonoid dalam daun sirih hijau. Quercetin berperan sebagai anti inflamasi, antioksidan, antibakteri dan anti kanker apabila diaplikasikan pada mamalia. Keunggulan daun sirih hijau dibandingkan dengan daun lainnya adalah kandungan total flavonoid tertinggi terdapat pada daun sirih hijau sebesar 39,84 mg/100g daun sirih hijau (Dwivedi dan Tripathi, 2014 ; Kaur *and* Mondal, 2014).

Fungsi lain yang dapat diambil dari daun sirih hijau (*Piper betle*) adalah aktivitas sebagai gastroprotektan, radio protektan dan inhibisi platelet, imunomodulator dan antifertilitas. Pengolahan daun sirih hijau sebagai *medicinal plant* dapat dilakukan secara konvensional yaitu dengan mengunyah daun sirih hijau ataupun meminum hasil rebusan daunnya atau dengan pengolahan secara modern yaitu dengan mengubahnya menjadi ekstrak maupun dengan mengubah bentuknya menjadi salep, gel maupun infusa (Pradhan *et al.*, 2013).

2.8 Tikus Putih (*Rattus norvegicus*)

Menurut Lostapa dkk. (2016), tikus putih (*Rattus norvegicus*) dapat digunakan dalam penelitian model luka insisi dengan mengukur kecepatan kesembuhan luka yang diberi amoksilin dan asam mefenamat. Penelitian yang dilakukan oleh Kumar *et al.* (2013), mengenai evaluasi penyembuhan luka menggunakan hewan model dilakukan dengan menggunakan tikus putih (*Rattus norvegicus*) yang diinsisi pada bagian kulit di lokasi para-vertebral sepanjang 1,5 cm. Luka insisi yang telah dibuat selanjutnya dilakukan penjahitan menggunakan benang *absorbable* sepanjang luka insisi.

Penelitian yang dilakukan oleh Jha *et al.* (2009), dilakukan dengan menggunakan tikus putih yang diberi perlakuan dengan membuat luka eksisi dan insisi serta diberikan terapi ekstrak alkohol dari *Sphaeranthus indicus* Linn. Metodologi yang dilakukan adalah dengan membuat luka eksisi dan insisi pada bagian para-vertebral. Luka insisi dibuat dengan panjang 2,5 cm yang selanjutnya dilakukan penjahitan dan diterapi menggunakan salep dari ekstrak alkoholik tumbuhan *Sphaeranthus indicus* Linn.



Gambar 2.8 Hewan Coba Tikus Putih (Banks *et al.*, 2010)

Klasifikasi tikus putih (*Rattus norvegicus*) menurut Banks *et al.* (2010) adalah sebagai berikut:

Kingdom	: Animalia
Filum	: Chordata
Subfilum	: Vertebrata
Kelas	: Mammalia
Ordo	: Rodentia
Subordo	: Odontoceti
Familia	: Muridae
Genus	: Rattus
Species	: <i>Rattus norvegicus</i>

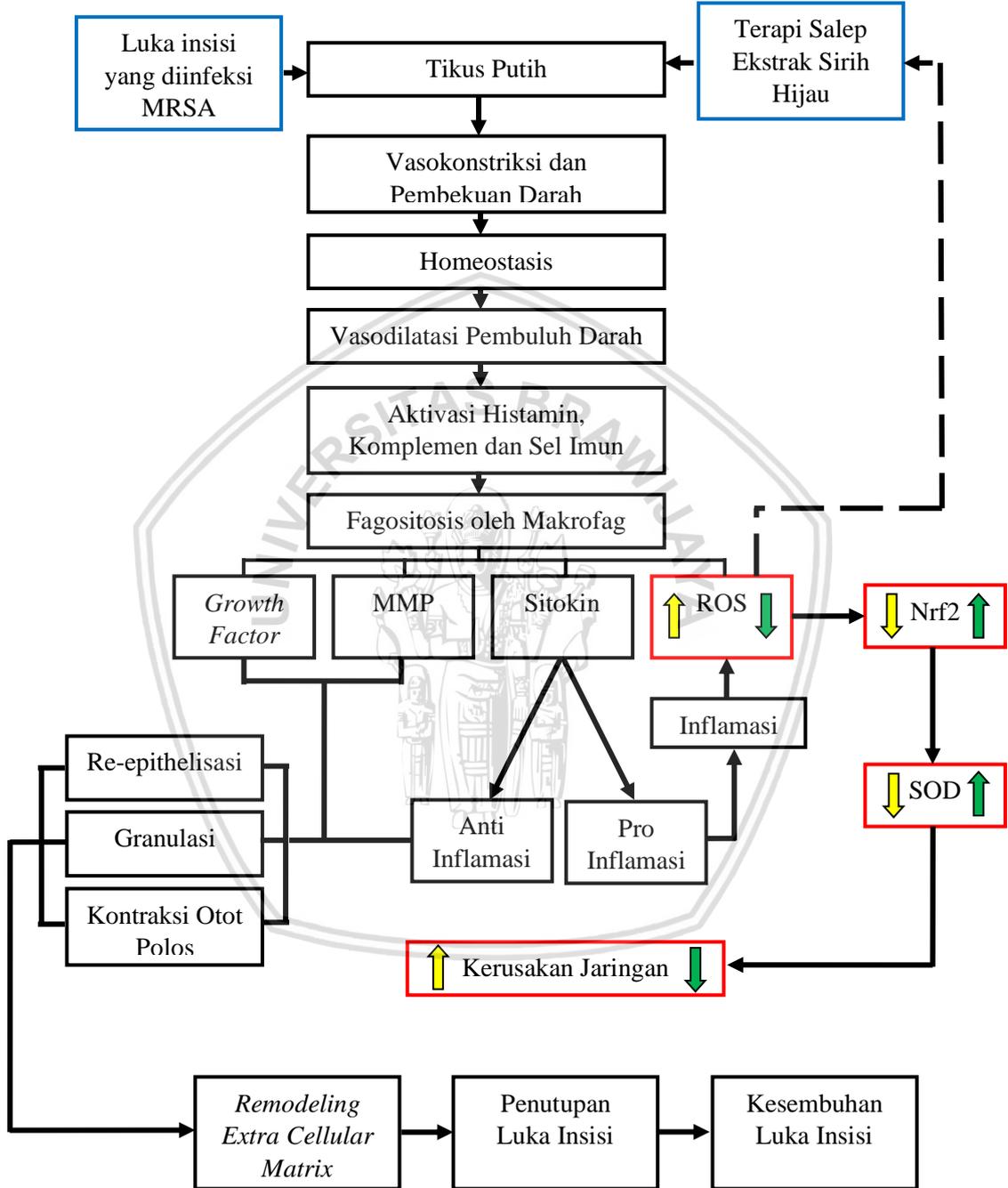
Secara fisiologis, tikus putih (*Rattus norvegicus*) memiliki masa hidup 2,5 – 3,5 tahun. Tikus putih jantan memiliki berat badan berkisar antara 450 – 520 gram sedangkan tikus putih betina berkisar antara 250 – 300 gram berat badan (**Gambar 2.8**). Suhu tubuh normal dari tikus putih yaitu berkisar antara 35,9°C sampai 37,5°C. Frekuensi denyut jantung tikus putih adalah 330 – 480 BPM dan frekuensi

napasnya berkisar antara 66 – 114 kali per menit. Tikus putih sebagai hewan coba memiliki kebutuhan air sebesar 8 – 11 mL/kg berat badan per hari semasa hidupnya (Sharp *et al.*, 2009).



BAB III KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1 Kerangka Konseptual



Keterangan:



: Variabel Bebas



: Efek Luka



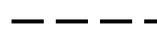
: Variabel Terikat



: Efek Terapi



: Alur Penyebab



: Menghambat

Luka akan menyebabkan kerusakan pada jaringan kulit. Jaringan kulit merupakan salah satu sistem mekanisme perlindungan pertama dari tubuh manusia maupun hewan. Bakteri dapat menkontaminasi suatu luka yang terjadi pada jaringan kulit. Kontaminasi dari bakteri tersebut dapat mempengaruhi kesembuhan luka. Salah satu jenis bakteri yang dapat mengkontaminasi dari luka insisi adalah *Staphylococcus aureus*. Penyembuhan luka merupakan suatu aktifitas tubuh dimana tubuh berusaha untuk membentuk kembali jaringan yang telah rusak agar kembali normal secara bentuk maupun fungsi fisiologis.

Proses penyembuhan luka terdiri dari beberapa tahapan yaitu fase homeostasis, fase inflamasi, fase proliferasi dan fase maturasi atau *remodeling*. Tahapan pertama dari proses penyembuhan luka adalah fase homeostasis. Fase homeostasis terjadi dalam waktu beberapa menit setelah terciptanya luka. Fase homeostasis menimbulkan respon vascular berupa vasokonstriksi pembuluh darah dan respon pembekuan darah oleh fibrinogen.

Tahapan kedua pada proses penyembuhan luka yaitu fase inflamasi yang berlangsung setelah tiga hari pasca terjadinya luka insisi. Fase inflamasi mengindikasikan terjadinya proses vasodilatasi vaskular. Vasodilatasi vaskular menyebabkan perbesaran pembuluh darah sehingga terjadi peningkatan laju aliran

darah dan perlambatan sirkulasi darah. Aktivasi histamine, sitokin proinflamasi dan fagositosis oleh makrofag terjadi dalam fase inflamasi. Proses fagositosis oleh makrofag memicu pelepasan bahan aktif seperti sitokin, *growth factors*, *Matrix Metalloproteinase* dan radikal bebas.

Infeksi bakteri menyebabkan aktivitas fagositosis oleh makrofag akan meningkatkan zat buangan dari aktivitas fagositosis yang berupa radikal bebas. Peningkatan nilai dari radikal bebas dalam tubuh akan mempengaruhi *Reactive Oxygen Species* (ROS). *Reactive Oxygen Species* (ROS) merangsang Nrf2 sebagai faktor transkripsi yang mengkode pembentukan senyawa antioksidan seperti SOD, Heme-oksigenase, Glutathione peroksidase dan lain sebagainya. Akumulasi ROS yang tinggi menyebabkan terlepasnya ikatan Nrf2 dan Keap1 selaku inhibitor Nrf2, sehingga Nrf2 menuju ke inti sel jaringan dan berikatan dengan ARE dan sMaf. Menempelnya Nrf2 pada promoter gen yang diikuti ikatan ARE dan sMaf menghasilkan sintesis senyawa antioksidan. SOD merupakan hasil dari sintesis senyawa antioksidan dari Nrf2 yang berfungsi mengikat radikal bebas yang berbasis atom Oksigen dan merubahnya menjadi senyawa peroksida melalui reaksi reduksi dan oksidasi radikal bebas.

Tahapan ketiga adalah fase proliferasi jaringan. Fase ini terjadi pada 3-24 hari pasca terjadinya luka. Fase proliferasi ini diawali dari aktivasi sitokin proinflamasi yang bersama dengan *transforming growth factor* dan *keratinocyte growth factor* memicu terjadinya re-epithelisasi jaringan kulit. Fase proliferasi merupakan fase dimana terjadi pembelahan secara mitosis dari sel epitel, sel endothel dan sel fibroblast. Sel-sel tersebut nantinya akan melakukan pembelahan

atau proliferasi pada jaringan luka yang nantinya akan menutup luka dan mengembalikan fungsi fisiologis dari luka. Tahapan terakhir yaitu fase *remodeling*. Fase ini berlangsung hingga satu sampai dua tahun. Jaringan yang mengalami proses penyembuhan luka pada fase ini akan mengalami maturasi sel sehingga jaringan yang akan terbuat menjadi jaringan yang kuat. Fase ini ditandai dengan berkurangnya jumlah fibroblast.

Pemberian terapi pada luka insisi yang diinfeksi Bakteri *Staphylococcus aureus* menggunakan salep ekstrak daun sirih hijau (*Piper betle*) akan memperpendek waktu dari inflamasi dan mengurangi jumlah radikal bebas dalam tubuh yang terjadi akibat fagositosis oleh makrofag. Zat aktif dari ekstrak sirih hijau sendiri memiliki sifat sebagai antibakteri, anti-inflamasi dan anti radikal bebas. Makrofag yang memfagositosis bakteri atau benda asing tubuh akan mengeluarkan beberapa zat aktif, salah satunya adalah radikal bebas. Salep ekstrak daun sirih hijau (*Piper betle*) dapat meningkatkan jumlah Nrf2 dan SOD sebagai senyawa antioksidan yang berfungsi menurunkan radikal bebas. Salep ekstrak daun sirih hijau berperan untuk mengurangi radikal bebas hasil fagositosis dengan cara merusak komponen utama dinding sel bakteri *Staphylococcus aureus* oleh molekul sterol yang berakibat membesarnya pori-pori dinding sel bakteri dan mengakibatkan bakteri mengalami degradasi dinding sel (Pradhan *et al.*, 2013).

3.2 Hipotesis Penelitian

- a. Salep ekstrak daun sirih hijau (*Piper betle*) dapat meningkatkan jumlah enzim *Superoxyde Dismutase* (SOD) pada tikus putih (*Rattus norvegicus*) model luka insisi yang diinfeksi bakteri *Staphylococcus aureus*.
- b. Salep ekstrak daun sirih hijau (*Piper betle*) dapat meningkatkan jumlah Nrf2 pada tikus putih (*Rattus norvegicus*) model luka insisi yang diinfeksi bakteri *Staphylococcus aureus*.



BAB IV METODE PENELITIAN

4.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Februari sampai dengan April tahun 2018. Pelaksanaan penelitian ini dilakukan pada beberapa laboratorium yaitu:

1. Laboratorium Epidemiologi Fakultas Peternakan Universitas Brawijaya Malang sebagai tempat pemeliharaan hewan coba dan pemberian perlakuan hewan coba.
2. Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang sebagai tempat pembuatan suspensi bakteri *Staphylococcus aureus* dengan konsentrasi 10^5 CFU/mL.
3. Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya Malang sebagai tempat inkubasi bakteri dan pengujian identifikasi dan kemurnian bakteri serta uji resistensi antibiotik.
4. Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang sebagai tempat pembuatan salep ekstrak daun sirih hijau (*Piper betle*)
5. Laboratorium Biomolekular Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Brawijaya Malang sebagai tempat pengujian total *Superoxyde Dismutase* (SOD) dan Nrf2.

4.2 Alat dan Bahan

Alat yang digunakan dalam pelaksanaan penelitian ini antara lain adalah kandang tikus, *dessecting set*, sterilisator, *automatic stirrer*, tabung reaksi, *flowcytometer*, *micropipette*, *yellow tip*, *blue tip*, *sentrifugator*, bunsen, neraca analitik, cawan petri, tabung ependorf, Teflon *homogenizer*, mortar, oven, *glove*,

masker, *software* *BD Cell Quest Pro* dan *software* *SPSS* sebagai pembantu perhitungan statistik.

Bahan yang digunakan adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) dengan umur 8-12 minggu dan berat 150 – 180 gram, daun sirih hijau, NaOH, HCl, vaselin album, alkohol 70 %, ketamine HCl, xylazine, media agar, aquadestilata, ethanol 70%, Media *Mannitol Salt Agar*, Media *Nutrient Broth*, Media *Nutrient Agar Slant*, NaCl Fisologis, Antibodi Anti-SOD dan Anti-Nrf2.

4.3 Tahapan Penelitian

4.3.1 Rancangan Penelitian dan Persiapan Hewan coba

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental dengan menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan dasar pengamatan *post control design only*. Setiap kelompok terdiri dari beberapa kelompok perlakuan tikus putih. Kelompok perlakuan dari penelitian ini adalah:

1. Kelompok 1 (K-): Tikus putih yang diinsisi secara aseptis dengan pemberian Povidone iodine 2%.
2. Kelompok 2 (K+): Tikus putih yang diinsisi dan diinfeksi bakteri *Staphylococcus aureus* dengan konsentrasi 10^5 CFU/mL dengan pemberian bahan dasar salep berupa vaselin album tanpa kandungan bahan aktif.
3. Kelompok 3 (P1): Tikus putih yang diinsisi dan diinfeksi bakteri *Staphylococcus aureus* 10^5 CFU/mL dengan terapi salep ekstrak daun sirih hijau (*Piper betle*) dengan konsentrasi 2,5%.

4. Kelompok 4 (P2): Tikus putih yang diinsisi dan diinfeksi bakteri *Staphylococcus aureus* 10^5 CFU/mL dengan terapi salep ekstrak daun sirih hijau (*Piper betle*) dengan konsentrasi 5%.
5. Kelompok 5 (P3): Tikus putih diinsisi dan diinfeksi bakteri *Staphylococcus aureus* 10^5 CFU/mL dengan terapi salep ekstrak daun sirih hijau (*Piper betle*) dengan konsentrasi 5%.

4.3.2 Penetapan Sampel Penelitian

Kriteria hewan coba model yang digunakan dalam penelitian ini adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur wistar jantan dengan berat 150 - 180 gram berumur 8 minggu. Penelitian ini menggunakan lima perlakuan, sehingga banyaknya pengulangan yang diperlukan dalam penelitian ini dihitung dengan menggunakan rumus $t(n-1) \geq 15$ (Montgomery and Kowalsky, 2011):

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

Keterangan:

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

t : Jumlah perlakuan

$$5n - 5 \geq 15$$

n : Jumlah ulangan

$$5n \geq 20$$

$$n \geq 4$$

Berdasarkan perhitungan yang telah dijabarkan di atas, maka untuk 5 macam kelompok perlakuan diperlukan jumlah ulangan minimal 4 kali dalam setiap kelompok perlakuan. Sehingga dalam penelitian ini dibutuhkan 20 ekor mencit.

4.3.3 Variabel Penelitian

Variabel yang diamati dalam penelitian ini adalah:

- a. Variabel bebas: Dosis terapi salep ekstrak daun sirih hijau (*Piper betle*).
- b. Variabel terikat: Total SOD dan Total Nrf2 .
- c. Variabel kontrol: Jenis tikus putih, umur, jenis kelamin, berat badan, pakan, kandang dan perlakuan insisi yang diinfeksi bakteri *Staphylococcus aureus*.

4.4 Prosedur Kerja

4.4.1 Persiapan Hewan Coba

Penelitian ini menggunakan hewan coba model berupa tikus putih. Tikus putih (*Rattus norvegicus*) yang digunakan dalam penelitian ini bergalur Whistar dengan jenis kelamin jantan. Berat badan tikus putih yang digunakan adalah 150 - 180 gram dan umur 8 minggu. Menurut Balqis dkk. (2014), sebelum dilakukan perlakuan pada penelitian maka tikus diadaptasikan dengan lingkungan laboratorium selama tujuh hari. Kandang yang digunakan bergantung pada jenis penelitian yang dilakukan. Kandang tikus diberikan alas berupa sekam dan diberikan pakan dalam bentuk pellet kecil dengan formula 10% dari berat tubuh dan minum secara *ad libitum*. Pakan diberikan setiap hari pada pagi hari dan sore hari sebanyak 3 gram per sekali makan. Kandang tikus putih dibuat dari material plastic yang pada bagian atasnya ditutup menggunakan rami kawat. Hewan coba penelitian ini dipelihara di Laboratorium Epidemiologi Fakultas Peternakan Universitas Brawijaya Malang.

4.4.2 Pembuatan Ekstrak Daun Sirih Hijau (*Piper betle*)

Penelitian ini menggunakan daun sirih hijau (*Piper betle*) sebagai bahan utama terapi luka insisi yang diinfeksi bakteri *Staphylococcus aureus*. Daun sirih hijau yang digunakan dalam penelitian ini diperoleh dari Pasar Blimbing dan diolah pada Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang. Daun sirih hijau (*Piper betle*) yang telah dikumpulkan selanjutnya dibersihkan dari kotoran yang masih menempel pada daun dengan cara dicuci hingga bersih. Daun yang telah kering selanjutnya dikeringkan menggunakan oven dengan suhu 55°C hingga kering. Daun yang telah kering akan memasuki tahap pengolahan selanjutnya yaitu digiling dan diayak menggunakan ayakan Mesh 20. Mesh merupakan ukuran lubang pada ayakan. Mesh 20 atau ayakan 20 Mesh menandakan bahwa dalam 1 inchi persegi terdapat 20 lubang (DepkesRI, 2000).

Ekstrak daun sirih hijau (*Piper betle*) dibuat dengan cara maserasi. Daun sirih hijau yang telah dijadikan serbuk diambil 1 kg dan dimasukkan dalam bejana. Langkah berikutnya yaitu ditambahkan 5 liter ethanol 70% dan ditutup. Rendaman serbuk daun sirih hijau dan ethanol 70% dibiarkan selama 3 hari sembari dilakukan pengadukan sehingga terdistribusi secara merata. Sari daun sirih hijau selanjutnya disaring dan ampas daunnya diperas. Ampas daun ditambahkan ethanol 70% secukupnya kemudian diaduk dan disaring, sehingga diperoleh 10 liter sari daun sirih hijau. Bejana selanjutnya ditutup dan sari daun sirih hijau didiamkan selama 2 hari sehingga terbentuk endapan. Endapan kemudian dipisahkan dan semua maserat dikumpulkan. Maserat diuapkan

dengan penguap suhu rendah 50°C menggunakan *syncore* dan dilanjutkan dengan *vacuum dry evaporator* untuk membuat ekstrak kental (DepkesRI, 2000).

4.4.3 Pembuatan Salep Ekstrak Daun Sirih Hijau (*Piper betle*)

Salep yang digunakan dalam penelitian ini merupakan salep yang dibuat dengan Vaseline album sebagai bahan dasar salep. Menurut Faradiba (2011), salep dengan basis Vaseline album merupakan dasar salep hidrokarbon. Cara pembuatan salep dengan Vaseline album adalah basis salep ditimbang pada neraca dan dipanaskan hingga meleleh dalam cawan porselen pada penagas air. Basis yang telah meleleh diaduk dalam mortar sehingga homogen. Alfa tokoferol dan propil paraben ditambahkan dan diaduk hingga homogen. Ekstrak yang telah dihitung konsentrasinya ditambahkan secara perlahan dan diaduk secara merata.

Vaseline album dipilih sebagai basis salep karena sifat salep dengan basis Vaseline album dapat melekat dengan baik pada luka. Basis Vaseline album juga dapat menutup luka dengan baik sehingga air pada luka dapat diserap oleh salep dan menumbulkan status hidrasi yang baik pada luka insisi. Status hidrasi yang baik pada kulit yang terkena luka akan membuat kulit semakin permeabel (Anief, 2006). Salep daun sirih hijau ini akan dibuat dalam konsentrasi 2,5%, 5% dan 7,5% sebanyak 140 gram dengan pembawa vaselin album (Wansyah dkk., 2017).

4.4.4 Pembuatan Suspensi Bakteri

Bakteri yang digunakan dalam penelitian ini adalah bakteri *Staphylococcus aureus*. Sebelum melakukan infeksi pada luka insisi perlu disiapkan bakteri yang akan diinfeksi yang meliputi 3 tahapan yaitu penyediaan biakan bakteri, pembuatan suspensi bakteri dan pembuatan standar Mc Farland. Penyediaan bakteri dilakukan dengan menimbang *Nutrient Agar* (NA) sebanyak 0,46 gram yang dilarutkan dalam 20 mL aquadestilata. Larutan selanjutnya dipanaskan dan dimasukkan dalam 3 tabung reaksi sebanyak 5 mL. Langkah selanjutnya adalah dengan melakukan sterilisasi tabung reaksi menggunakan autoklaf pada suhu 121°C dan tekanan 1 atmosfer selama 15 menit. Tabung reaksi yang telah steril selanjutnya dimiringkan dan didiamkan hingga media agar memadat. Bakteri *Staphylococcus aureus* kemudian diinokulasikan menggunakan ose pada media agar miring. Media diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam (Hasmila dkk., 2015).

Langkah berikutnya yaitu pembuatan suspensi bakteri *Staphylococcus aureus*. Hasil biakan bakteri *Staphyococcus aureus* dimasukkan dalam tabung reaksi berisi 2 mL NB (*Nutrient Broth*) menggunakan ose. Tabung reaksi berisi NB (*Nutrient Broth*) dan biakan bakteri selanjutnya dikocok dan dibandingkan dengan kekeruhan standar Mc Farland. Standar Mc Farland dibuat dengan cara melarutkan H₂SO₄ sebanyak 99,5 mL dicampurkan dengan larutan BaCl₂.2H₂O 1,175% sebanyak 0,5 mL kedalam tabung erlen meyer. Campuran larutan tersebut dikocok hingga homogen dan terbentuk larutan yang keruh.

Kekeruhan ini yang digunakan sebagai standar kekeruhan suspensi bakteri (Hasmila dkk., 2015).

4.4.5 Pembuatan Luka Infeksi pada Tikus

Hewan coba yang telah diaklimatisasi selama 7 hari pada kandang penelitian disiapkan untuk pembuatan luka insisi. Setiap individu hewan coba dilakukan *labelling* menggunakan spidol tahan air pada ekor tikus putih sesuai dengan kelompok perlakuan. Tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan dengan berat badan 150 - 180 g dianesthesia menggunakan kombinasi ketamine dengan dosis 40 mg/kg berat badan dan xylazine 5 mg/kg berat badan. Ketamine dan Xylazin dicampurkan dengan perbandingan 1:1 pada spuit. Injeksi anesthesia dilakukan via intra muskular dengan dosis 0,1 mL/kg berat badan (Plumb, 2008).

Tikus putih yang telah teranesthesi selanjutnya dibersihkan rambut pada bagian punggung dengan cara dibasuh air sabun sebelum dicukur dan dicukur menggunakan pisau cukur. Punggung tikus putih yang telah bersih dari rambut kemudian diolesi alkohol 70% sebelum dilakukan insisi. Luka insisi dibuat di daerah dorsal dari tikus putih. Pembuatan luka insisi dilakukan sepanjang 4 cm searah dengan *longitudinal midline* dengan lebar luka 5 mm dan kedalaman luka kurang lebih 1,5 mm hingga menembus bagian subkutan kulit (Dai *et al.*, 2011). Luka yang telah terbentuk selanjutnya diinfeksi dengan suspensi bakteri *Staphylococcus aureus* yang telah disesuaikan dengan standar Mc Farland 1 dengan kekeruhan bakteri 3×10^8 yang diencerkan hingga 10^5 CFU/mL. Infeksi dilakukan dengan cara meneteskan suspensi bakteri *Staphylococcus aureus*

dengan volume 30 μ L sepanjang luka insisi dan didiamkan selama 48 jam. Luka insisi yang telah diinfeksi dibiarkan dengan jangka waktu 48 jam bertujuan untuk menginkubasi bakteri *Staphylococcus aureus* sehingga infeksi dapat berlangsung secara optimal (Santana *et al.*, 2015 ; Sayogo dkk., 2017).

4.4.6 Terapi Salep Ekstrak Daun Sirih Hijau (*Piper betle*)

Pemberian terapi dilakukan setelah 48 jam paca infeksi menggunakan bakteri *Staphylococcus aureus*. Pemberian terapi salep ekstrak daun sirih hijau diberikan dua kali sehari selama enam hari. Salep ekstrak daun sirih hijau diberikan 0,1 gram dengan cara dioleskan pada sepanjang luka insisi. Pengolesan salep ekstrak daun sirih hijau dilakukan secara aseptis untuk mencegah kontaminasi bakteri lain yang akan berdampak bias pada penelitian (Jha *et al.*, 2009).

4.4.7 Pengambilan Jaringan Kulit

Pengambilan jaringan kulit pada penelitian ini diambil pada hewan coba tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur whistar dengan jenis kelamin jantan, berat badan 150 - 180 gram dan umur 8 minggu dilakukan pada hari ke 15 setelah pemberian perlakuan penelitian. Teknik pengambilan jaringan dilakukan dengan euthanasia pada tikus putih secara dislokasi os occipital. Tikus putih yang telah mati selanjutnya dibersihkan dari rambut pada sekitar luka insisi. Sampel jaringan diambil dengan memotong bagian kulit hingga subkutan. Pengambilan jaringan kulit tikus putih dilakukan dengan memotong kulit dengan jarak 1 cm dari bagian kanan dan kiri luka serta kedua ujung luka sepanjang 2,5 cm membentuk persegi. Jaringan kulit yang akan digunakan

untuk pengujian aktivitas enzim SOD dan Nrf2 dimasukkan dalam cawan petri dan segera dilakukan pengujian (Jusuf, 2009).

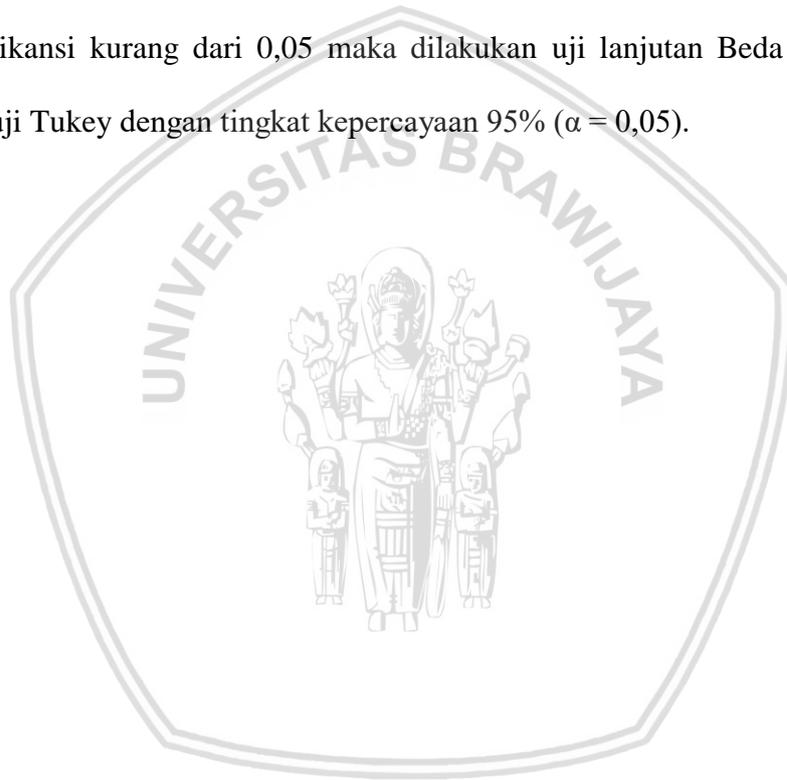
4.4.8 Pengujian Total Enzim *Superoxyde Dismutase* (SOD) dan Nrf2

Metode yang digunakan dalam pengujian enzim *Superoxyde Dismutase* (SOD) dilakukan dengan menggunakan flowsitometri. Sampel kulit yang telah dikoleksi selanjutnya dibilas menggunakan PBS (*Phosphate Buffer Saline*) sebanyak dua kali dan diletakkan dalam cawan petri yang berisi 5 mL PBS. Sampel kulit selanjutnya digerus menggunakan mortar dan dihomogenisasi dengan PBS hingga menjadi suspensi. Sel-sel pada jaringan kulit diperoleh dari hasil isolasi suspense sampel jaringan kulit menggunakan ayakan 200 mesh yang kemudian dilakukan sentrifugasi dengan kecepatan 1500 rpm pada suhu 20 °C selama 5 menit.

Pellet yang didapatkan dari hasil sentrifugasi disuspensikan dengan 1 mL PBS dan dilakukan *pipeting* untuk mendapatkan homogenat. Sebanyak 200 μ L homogenate dipindahkan menuju tabung mikrosentrifus dan ditambahkan 500 μ L PBS. Prosedur selanjutnya adalah dilakukan sentrifugasi dengan kecepatan 1500 rpm selama 5 menit pada suhu 20 °C. *Pellet* selanjutnya direndam dalam *cytofix* dan *cytoferm* selama 20 menit dan dilakukan staining menggunakan antibody Anti-SOD atau Anti-Nrf2 dan dikonjugasi dengan label protein. Kemudian data hasil dari *flowcytometri* dianalisis dengan menggunakan *software* BD *cellquest Pro*TM. Program diatur sesuai dengan pewarnaan dan jenis sel yang diidentifikasi.

4.4.9 Analisis Data

Hasil dari pengukuran total *Superoxyde Dismutase* dan Nrf2 dilakukan perhitungan rata-rata dan dilanjutkan menggunakan standar deviasi. Data yang diperoleh kemudian diolah menggunakan *software SPSS Statistics*. Analisis data pengukuran total *Superoxyde Dismutase* dan Nrf2 menggunakan uji *one way ANOVA* dengan tingkat kepercayaan 95% ($\alpha = 0,05$) dan apabila nilai signifikansi kurang dari 0,05 maka dilakukan uji lanjutan Beda Nyata Jujur atau uji Tukey dengan tingkat kepercayaan 95% ($\alpha = 0,05$).



BAB V HASIL DAN PEMBAHASAN

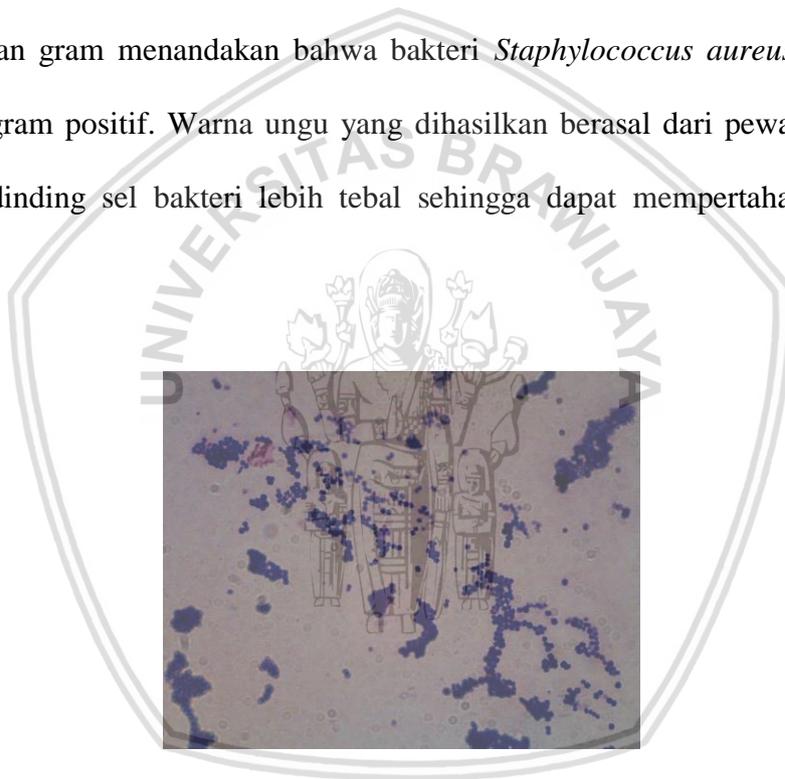
5.1 Identifikasi Bakteri *Staphylococcus aureus*

Identifikasi bakteri *S.aureus* dilakukan beberapa uji diantaranya adalah uji morfologi bakteri menggunakan media NAP (*Nutrient Agar Plate*), uji kemurnian bakteri menggunakan media MSA (*Mannitol Salt Agar*), pewarnaan gram dan uji resistensi bakteri *S.aureus* dengan beberapa antibiotik (**Lampiran 3**) untuk membuktikan bakteri *S.aureus* tersebut memiliki sifat MDR (*Multidrug Resistant*). Uji morfologi bakteri *S.aureus* pada media NAP (**Gambar 5.1**) menunjukkan bakteri *S.aureus* membentuk koloni berbentuk bulat, menonjol dan berwarna keemasan. Menurut Harris *et al.* (2002), bakteri *S.aureus* yang dibiakkan pada media NAP akan membentuk koloni bulat dengan permukaan yang timbul serta warna keemasan.



Gambar 5.1 Uji Morfologi Bakteri pada Media NAP (Dokumentasi Pribadi, 2018)

Pewarnaan gram pada penelitian ini dilakukan untuk melakukan identifikasi terhadap *S.aureus* dengan memperhatikan morfologi sel bakteri. Hasil pengamatan pada mikroskop adalah bakteri berbentuk bulat (*coccus*), berwarna keunguan dan bergerombol seperti anggur (**Gambar 5.2**). Menurut Dewi (2013), hasil pewarnaan gram *Staphylococcus aureus* berwarna ungu dengan koloni berbentuk anggur, tetrad, berpasangan maupun individu. Warna ungu hasil pewarnaan gram menandakan bahwa bakteri *Staphylococcus aureus* merupakan bakteri gram positif. Warna ungu yang dihasilkan berasal dari pewarna pertama karena dinding sel bakteri lebih tebal sehingga dapat mempertahankan warna ungu.



Gambar 5.2 Pewarnaan Gram Bakteri *Staphylococcus aureus* (Dokumentasi Pribadi, 2018)

Uji kemurnian bakteri *S.aureus* dilakukan dengan menggunakan MSA (**Gambar 5.3**). Uji kemurnian bakteri *S.aureus* menunjukkan bahwa biakan murni bakteri *S.aureus* yang dibiakkan pada media tersebut merubah warna MSA yang semula merah menjadi kuning. MSA merupakan media selektif differensial untuk isolasi bakteri *S.aureus*. Media ini dapat menghambat pertumbuhan bakteri lain

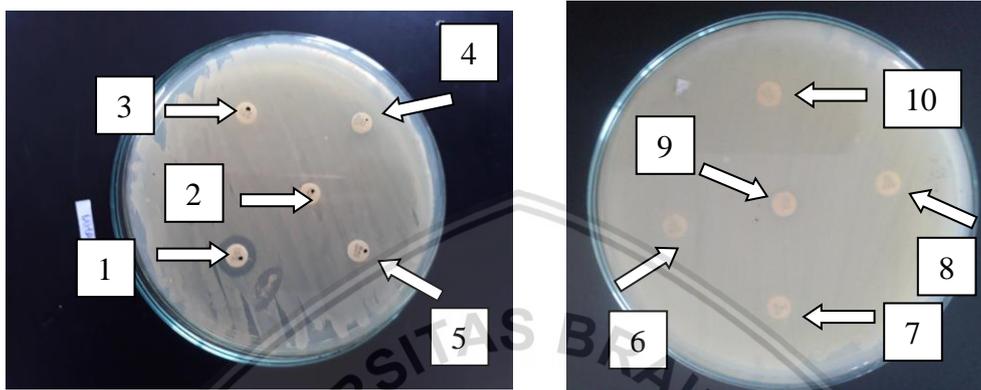
selain bakteri *S.aureus*. Bakteri *S.aureus* yang dibiakkan pada MSA akan merubah warna merah pada agar menjadi kuning akibat adanya fermentasi mannitol yang disebabkan adanya enzim koagulase pada bakteri *S.aureus*. Zona kuning yang dibentuk disebabkan karena adanya zat asam yang dihasilkan sehingga dapat menyebabkan perubahan warna *phenol red* pada agar menjadi berwarna kuning (Aryal, 2018).



Gambar 5.3 Uji Kemurnian Bakteri *Staphylococcus aureus* (Dokumentasi Pribadi, 2018)

Uji resistensi antibiotik dilakukan dengan menggunakan beberapa antibiotik seperti Penicillin, Methicillin, Cefotaxime, Ciprofloxacin, Clindamycin, Tetracycline, Gentamicin, Trimethoprim, Cefadroxil dan Amoxicillin (**Lampiran 4**). Hasil yang didapatkan pada uji resistensi antibiotik yaitu bakteri *S.aureus* mengalami resistensi terhadap antibiotik golongan penicillin, aminoglikosida, chepalosporin, tetracyclin dan floroquinone (**Gambar 5.4**). *Multidrug resistant* merupakan kemampuan bakteri dalam bertahan terhadap tiga atau lebih golongan antibiotik yang berbeda. Uji resistensi bakteri dilakukan pada media MHA

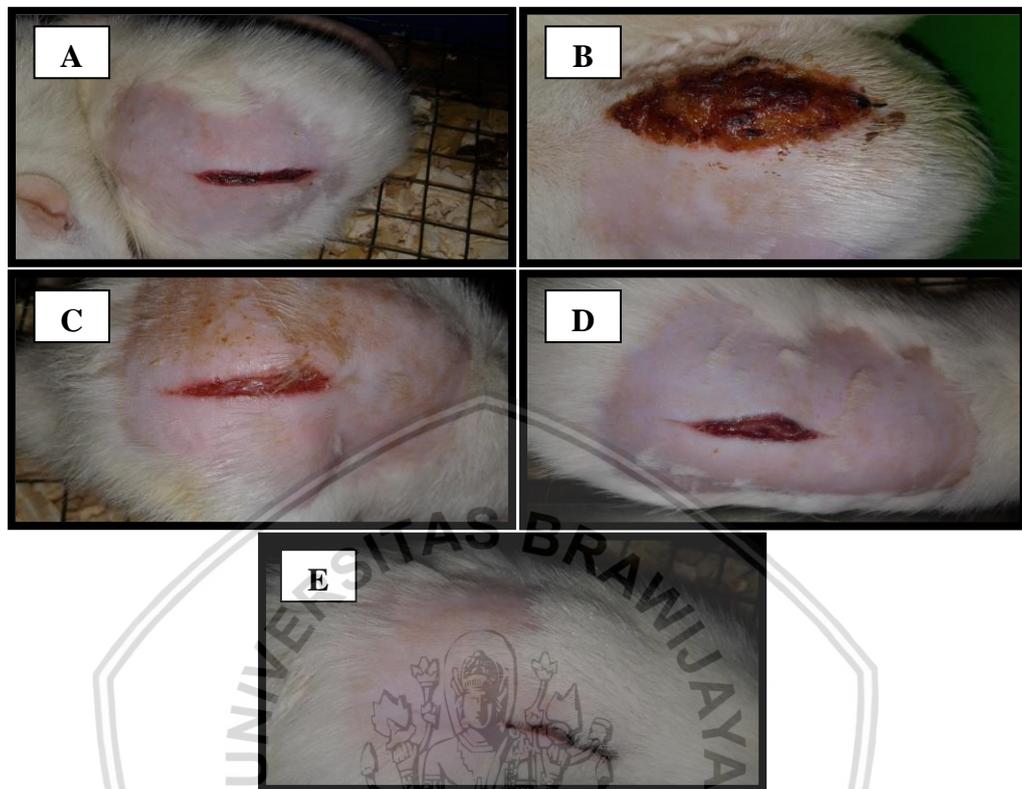
(*Muller Hinton Agar*) dengan membiakkan bakteri *S.aureus* pada media kemudian dilakukan pemasangan *antibiotic disc* dan diinkubasi (Duran *et al.*, 2012).



Gambar 5.4 Uji Resistensi Bakteri *Staphylococcus aureus* (Dokumentasi Pribadi, 2018). Keterangan: Amoxicillin (1), Cefadroxil (2), Cefotaxime (3), Ciprofloxacin (4), Clindamycin (5), Gentamicin (6), Methicillin (7), Penicillin (8), Tetracyclin (9), Trimethoprim (10).

5.2 Pengamatan Makroskopis Pemberian Salep Ekstrak Daun Sirih Hijau pada Tikus Putih Model Luka Insisi yang Diinfeksi *Staphylococcus aureus*

Hewan coba tikus putih (*Rattus norvegicus*) strain wistar dengan berat badan yang berkisar antara 150 – 180 gram diinsisi pada bagian punggung sepanjang 4 cm dan diinfeksi dengan *Methicillin-Resistance Staphylococcus aureus* (MRSA). Gambaran makroskopis diambil dengan tujuan mengetahui perkembangan kesembuhan luka pada hewan coba. Kesembuhan luka dapat dilihat dari luas permukaan luka, pertumbuhan rambut dia area sekitar luka dan keringnya luka.



Gambar 5.5 Gambaran makroskopis luka insisi yang diinfeksi *Staphylococcus aureus* kelompok kontrol negatif (A), kontrol positif (B), P1 (C), P2 (D) dan P3 (E) pada hari ke-8

Hasil yang didapatkan pada penelitian ini adalah gambaran makroskopis pada kontrol negatif (**Gambar 5.5 A**) menunjukkan luka belum menutup sempurna, luka dalam keadaan lembab dan tidak ada pertumbuhan rambut disekitar luka. Gambaran makroskopis kelompok kontrol positif (**Gambar 5.5 B**) menunjukkan luka masih terbuka lebar, terdapat jaringan parut dan luka dalam keadaan basah. Kelompok P1 dan P2 (**Gambar 5.5 C dan D**) memperlihatkan gambaran makroskopis berupa luka yang mulai mengering namun belum menutup secara sempurna dan tidak ada pertumbuhan rambut. Gambaran makroskopis yang diperlihatkan oleh kelompok P3 (**Gambar 5.5 E**) adalah luka yang telah kering dan menutup serta terdapat pertumbuhan rambut disekitar luka.

5.3 Pengaruh Pemberian Salep Ekstrak Daun Sirih Hijau Terhadap Jumlah SOD pada Tikus Putih Model Luka Insisi yang Diinfeksi *Staphylococcus aureus*

Jumlah SOD pada jaringan kulit tikus putih model luka insisi yang diinfeksi MRSA dan dilakukan terapi menggunakan salep ekstrak daun sirih hijau (*Piper betle*) dapat diamati secara kuantitatif menggunakan metode *flowcytometry* (Lampiran 7). Penggunaan metode *flowcytometry* ini dilakukan dengan memasukkan olahan sampel yang diubah dalam bentuk suspensi dalam *flowcytometer* dan dianalisa menggunakan perangkat lunak. Hasil yang didapatkan berdasarkan analisa tersebut adalah rata-rata SOD tertinggi diperoleh kelompok P3 dengan terapi salep 7,5% dan terendah oleh kelompok kontrol positif. Berdasarkan uji *one way ANOVA* terdapat pengaruh yang nyata ($p < 0,05$) terhadap terapi yang diberikan. Hasil uji BNJ dapat dilihat pada pada **Tabel 5.1** berikut ini.

Tabel 5.1 Perhitungan Rata-rata Jumlah SOD

Kelompok Perlakuan	Rata-rata Sel yang Mengekspresikan SOD \pm SD (%)	Persentase Peningkatan (%)	Persentase Penurunan (%)
K-	36.26 \pm 3.24204 ^{ab}	-	-
K+	16,90 \pm 0.47308 ^a	-	53.39
P1	33.14 \pm 0.06055 ^b	96.09	-
P2	37.43 \pm 0.26260 ^c	121.48	-
P3	38.69 \pm 0.43070 ^c	133.73	-

Keterangan: Notasi yang berbeda menunjukkan adanya perbedaan yang nyata ($P < 0,05$)

P3 memiliki perbedaan yang signifikan terhadap K-, K+ dan P1. K- tidak memiliki perbedaan yang nyata terhadap K+ dan P1. Beda nyata ditunjukkan dengan adanya perbedaan notasi statistika hasil uji Beda Nyata Jujur. Nilai P2 dan P3 tidak berbeda nyata disebabkan oleh notasi statistik yang sama. P3 memiliki

rata-rata jumlah SOD paling tinggi diantara kelompok perlakuan lain. Hal tersebut menunjukkan bahwa dengan konsentrasi salep 7,5%, senyawa flavonoid membantu membentuk enzim SOD yang dihasilkan pada sitosol sehingga jumlah enzim SOD yang dihasilkan lebih banyak daripada perlakuan lain. Bakteri *S.aureus* yang diinfeksi pada tikus putih akan menyebabkan terjadinya fagositosis yang berlebih dari neutrofil. Menurut Kobayashi *et al.* (2014), MRSA yang diinfeksi pada luka akan merangsang neutrofil untuk melakukan fagositosis terhadap bakteri. Fagositosis yang berlebih akan menghasilkan residu berupa ROS sehingga meningkatkan jumlah ROS dalam tubuh. Peningkatan ROS dalam tubuh akan merangsang pembentukan SOD pada sel sebagai antioksidan primer dalam menangani jumlah ROS yang berlebih (Le Quere *et al.*, 2014). Pemberian senyawa polifenol dan flavonoid dalam salep ekstrak daun sirih hijau akan membantu meningkatkan produksi enzim SOD pada tubuh sehingga dapat mengurangi jumlah ROS yang berlebih (Dwivedi dan Tripathi, 2014 ; Kaur and Mondal, 2014).

Enzim *Superoxide Dismutase* (SOD) merupakan suatu enzim yang berperan sebagai antioksidan pada tubuh dalam menangani radikal bebas berbasis atom Oksigen atau *Reactive Oxygen Species* (ROS). SOD dalam proses kesembuhan luka pada luka insisi yang diinfeksi bakteri *Staphylococcus aureus* berperan dalam mengikat ROS hasil fagositosis bakteri *Staphylococcus aureus* oleh neutrofil dan mengubahnya menjadi senyawa peroksida dengan menggunakan reaksi reduksi-oksidasi (Cristiana *et al.*, 2014). SOD diproduksi dalam sitosol sel oleh rangsangan dari ROS. ROS merangsang pembentukan antioksidan khususnya

SOD dengan cara mensinyalasi Nrf2 untuk berikatan dengan reseptor antioksidan dalam nukleus sehingga menghasilkan beberapa antioksidan seperti hemeoxygenase, glutathione peroxidase dan khususnya SOD (Ambrozova *et al.*, 2017).

Beberapa senyawa fitokimia yang terdapat dalam ekstrak daun sirih hijau yang dapat membantu meningkatkan jumlah enzim SOD seperti senyawa flavonoid, polifenol dan vitamin C. Kemampuan senyawa flavonoid pada ekstrak daun sirih hijau dalam meningkatkan jumlah SOD dilakukan dengan cara sebagai induktor dalam jalur protein kinase (MAPK dan PKC) dalam membentuk enzim antioksidan dalam sel (Brunetti *et al.*, 2013). Selain berperan dalam jalur protein kinase dalam pembentukan antioksidan, flavonoid juga berperan dalam menginduksi enzim detoksifikasi fase II seperti NADPH-quinone oxireduktase dan Glutathione S Transferase yang berperan dalam menangani *stress* oksidatif selain enzim SOD. Flavonoid dapat bekerja secara langsung dalam menangani ROS mendonorkan molekul hidrogen pada senyawa radikal superoksida maupun dengan melakukan reduksi (Kumar *et al.*, 2014). Menurut Khassaf *et al.* (2003) Vitamin C memiliki peran dalam menstimulasi pembentukan SOD dengan cara mengatur ekspresi protein pada fase transkripsional dan post-translasi. Vitamin C yang terletak pada sitoplasma dan mitokondria yang merupakan tempat enzim SOD terbanyak. Senyawa polifenol berperan dalam meningkatkan enzim SOD sebagai antioksidan dengan cara menginduksi secara tidak langsung melalui jalur ARE dan berperan sebagai sitoprotektif protein untuk enzim antioksidan seperti SOD (Lin Hu, 2011).

5.4 Pengaruh Pemberian Salep Ekstrak Daun Sirih Hijau Terhadap Jumlah Nrf2 pada Tikus Putih Model Luka Insisi yang Diinfeksi *Staphylococcus aureus*

Pengukuran jumlah Nrf2 dilakukan menggunakan *flowcytometer*. Hasil pengukuran jumlah Nrf2 menunjukkan kelompok perlakuan 3 mendapatkan rata-rata jumlah Nrf2 tertinggi sedangkan rata-rata jumlah Nrf2 terendah didapatkan oleh kelompok perlakuan 2. Hasil rata-rata jumlah relatif Nrf2 hasil *flowcytometry* disajikan dalam **Tabel 5.2** sebagai berikut.

Tabel 5.2 Perhitungan Rata-rata Jumlah Nrf2

Kelompok Perlakuan	Rata-rata Sel yang Mengekspresikan Nrf2 ± SD (%)	Persentase Peningkatan (%)	Persentase Penurunan (%)
K-	47.70 ± 1.77 ^b	-	-
K+	34,17 ± 1.69 ^a	-	22.07
P1	35.25 ± 7.41 ^a	3.16	-
P2	47.84 ± 5.84 ^b	36.81	-
P3	52.09 ± 3.40 ^b	52.44	-

Keterangan: Notasi yang berbeda menunjukkan adanya perbedaan yang nyata ($P < 0,05$)

Pada **Tabel 5.2**, hasil yang didapatkan dari uji *One Way ANOVA* menunjukkan bahwa nilai $P < 0,05$ sehingga dapat dilanjutkan dengan uji *Tukey* atau Beda Nyata Jujur untuk mengetahui beda nyata atau pengaruh dari terapi yang dilakukan. Perbedaan notasi menunjukkan adanya perbedaan yang nyata antar kelompok perlakuan. Rata-rata jumlah relatif Nrf2 pada P3 berbeda nyata dengan K+ dan P1 namun tidak berbeda nyata dengan K- dan P2. Nilai rata-rata Nrf2 yang dihasilkan paling tinggi dihasilkan oleh kelompok P3. Tingginya konsentrasi ekstrak daun sirih hijau pada terapi salep P3 menunjukkan semakin banyak jumlah senyawa flavonoid dalam salep sehingga berpotensi untuk

menghasilkan Nrf2 yang lebih tinggi. Senyawa flavonoid merupakan induktor untuk aktivitas Nrf2 (Ambrozova *et al.*, 2017).

Penelitian ini menggunakan bakteri *S.aureus* strain MRSA untuk menginfeksi tikus putih model luka insisi. MRSA merupakan strain bakteri *S.aureus* yang memiliki sifat *multidrug resistant* dan memiliki beberapa enzim untuk melakukan resistensi terhadap sel PMN seperti leukosidin, koagulase dan hyaluronidase. Infeksi oleh bakteri *Staphylococcus aureus* strain MRSA dalam kulit yang diinsisi menyebabkan aktifnya sistem pertahanan tubuh oleh sel polimorfonuklear (PMN). Sel PMN yang telah tersinyalisasi karena adanya bakteri akan menuju tempat infeksi untuk melakukan fagositosis. Fagositosis merupakan proses eliminasi bakteri yang dilakukan oleh sel PMN dengan cara mencerna bakteri. Bakteri yang difagositosis oleh sel PMN menghasilkan produk berupa MMP, *growth factor*, sitokin dan residu berupa radikal bebas (Kobayashi *et al.*, 2015). Radikal bebas yang dihasilkan merupakan radikal bebas superoksida atau ROS. Kelebihan jumlah ROS dalam tubuh menyebabkan kerusakan jaringan dan memperlambat proses kesembuhan luka. Jumlah ROS yang berlebih merangsang pembentukan antioksidan dengan cara menginduksi jalur ARE yang berkaitan dengan metabolisme Nrf2 sehingga terbentuk beberapa antioksidan seperti SOD, Hemeoksigenase dan Glutathione S Transferase (Ambrozova *et al.*, 2017).

Nrf2 atau *Nuclear factor-erythroid related factor 2* merupakan suatu protein yang berfungsi sebagai faktor transkripsi sitosol. Nrf2 berfungsi untuk pertahanan biologis terhadap stress oksidatif dan xenobiotik. Mekanisme kerja dari Nrf2 yaitu

dengan membentuk berbagai macam antioksidan seperti SOD, Glutathione peroksidase, Heme-oksigenase dan lain sebagainya (Yasuda *et al.*, 2016). Metabolisme Nrf2 pada kondisi normal akan terikat pada protein Keap-1 untuk melakukan degradasi. Stress oksidatif menyebabkan ROS berikatan dengan MAPK dan protein kinase. Reaksi ini berlanjut pada reaksi fosforilasi yang menyebabkan Nrf2 melepas ikatan dengan protein Keap-1. Nrf2 selanjutnya masuk ke inti sel dan berikatan dengan ARE reseptor di gen bersama protein MAF. Ikatan tersebut menyebabkan produksi antioksidan. Produksi antioksidan yang telah cukup untuk mengurangi jumlah ROS menstimulasi protein Keap-1 untuk kembali mengikat Nrf2 pada promotor gen. protein Keap-1 akan masuk kedalam inti sel dan melepas ikatan antara reseptor ARE dengan Nrf2 dan MAF dengan cara mengikat kembali Nrf2 secara langsung dan membawanya ke sitosol untuk dilakukan degradasi. Degradasi Nrf2 bertujuan untuk stabilisasi antioksidan (Ambrozova *et al.*, 2017).

Salep ekstrak daun sirih hijau mengandung beberapa senyawa fitokimia yang dapat membantu menstimulasi kinerja Nrf2 dalam membentuk antioksidan untuk mengeliminasi jumlah ROS yang berlebih dalam tubuh. Senyawa-senyawa yang terdapat dalam ekstrak daun sirih hijau yang berperan sebagai induktor Nrf2 adalah flavonoid, polifenol dan vitamin C. Menurut Lin Hu (2011), senyawa polifenol dapat berperan sebagai antioksidan secara langsung maupun secara induktor dengan cara menginduksi pembentukan antioksidan. Senyawa polifenol berperan menangani ROS dengan cara mendonorkan atom hidrogen pada radikal bebas. Secara tidak langsung, senyawa polifenol berperan dengan cara

menginduksi jalur ARE pada Nrf2 sehingga dapat menghasilkan antioksidan dan berperan sebagai agen sitoprotektif. Senyawa berikutnya adalah flavonoid dan catechol yang bekerja melalui tiga jenis reaksi. Menurut Smirnova *et al.* (2016), reaksi pertama adalah reaksi langsung dengan cara membentuk radikal semiquinone untuk memodifikasi gugus thiol Keap-1 sehingga Nrf2 dapat berikatan dengan reseptor ARE pada inti sel. Mekanisme kedua adalah secara tidak langsung dengan cara mengaktifkan kerja protein kinase, reaksi fosforilasi Nrf2 dan induksi gen terikat Nrf2. Mekanisme ke tiga adalah dengan mengikat langsung radikal bebas dalam tubuh dengan cara mendonorkan atom sehingga radikal bebas tidak dapat mengikat makro molekul dalam tubuh. Menurut penelitian yang dilakukan oleh Mikrirova dan Scimecca (2016), vitamin c atau asam askorbat yang terdapat pada ekstrak daun sirih hijau dapat meningkatkan ekspresi Nrf2 sehingga Nrf2 dapat menghasilkan antioksidan untuk mengatasi jumlah ROS yang berlebihan dalam tubuh.

BAB VI KESIMPULAN DAN SARAN

6.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian dan pembahasan yang telah disampaikan dapat diambil kesimpulan bahwa:

1. Pemberian salep ekstrak daun sirih hijau (*Piper betle*) dengan konsentrasi 2,5%, 5% dan 7,5% dapat meningkatkan jumlah SOD pada tikus putih (*Rattus norvegicus*) model luka insisi yang diinfeksi *Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus* (MRSA).
2. Pemberian salep ekstrak daun sirih hijau (*Piper betle*) dengan konsentrasi 2,5%, 5% dan 7,5% dapat meningkatkan jumlah Nrf2 pada tikus putih (*Rattus norvegicus*) model luka insisi yang diinfeksi *Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus* (MRSA).

6.2 Saran

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai terapi salep ekstrak daun sirih hijau (*Piper betle*) terhadap luka insisi yang diinfeksi MRSA terhadap jumlah SOD dan Nrf2 maupun jenis antioksidan lain dengan memperbaiki ketepatan waktu pemberian terapi dan meningkatkan frekuensi pemberian terapi pada hewan model sehingga diperoleh kesembuhan luka baik.

DAFTAR PUSTAKA

- Almeida, G. C. M., N. G. M Lima dan Santos M. M. 2014. Prevalence and Factors Associated with Wound Colonization by *Staphylococcus aureus* in Hospitalized Patients in Northeastern Brazil. *BMC Infectious Disease Volume 1 Number 14*. Brazilia
- Ambrozova, N., J. Ulrichova and A. Galandakova. 2017. Models for The Study of Skin Wound Healing and The Role of Nrf2 and NF-kB. *Journal of Biomed Pap Med University of Palacky Olomouc Czech Republic Volume 161 Number 1*. Republik Ceko
- Anief. 2006. *Farmasetika*. Gadjah Mada University Press. Yogyakarta
- Aryal, S. 2016. *Mannitol Salt Agar for the Isolation of Staphylococcus aureus*. <<https://microbiologyinfo.com/wp-content/uploads/2016/09/Mannitol-Salt-Agar-for-the-isolation-of-Staphylococcus-aureus.pdf>> [Diakses tanggal 23 Maret 2018]
- Balqis, U., Rasmidar dan Marwiyah. 2014. Gambaran Histopatologis Penyembuhan Luka Bakar Menggunakan Daun Kedondong (*Spondias Dulcis F.*) dan Minyak Kelapa pada Tikus Putih (*Rattus Norvegicus*). *Jurnal Medika Veterinaria Volume 8 Nomor 1 Universitas Syiah Kuala*. Aceh
- Banks R. E., J. M. Sharp, S. D. Doss and D. A. Vanderford. 2010. *Exotic Small Mammal Care and Husbandry*. Wiley-Blackwell. Philadelphia
- Baroroh, D. B. 2011. *Konsep Luka*. Fakultas Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Malang. Malang
- Battacharya, S. 2015. *Reactive Oxygen Species and Cellular Defense System*. Springer. India
- Brunette, C., M. Di Fernandino, A. Fini, S. Pollastri and M. Tattini. 2013. Flavonoids as Antioxidants and Developmental Regulators: Relative Significance in Plants and Humans. *Journal of Molecular Sciences Volume 14*. Italy
- Cemelli, E., A. Baumgatner and Anderson, D. 2009, Antioxidant and The Comet Assay. *Journal of Mutation Research Volume 2 Number 2*. UK
- Chen, Y and J. Lyga. 2014. Brain-Skin Connection: Stress, Inflammation and Skin Aging. *Journal of Inflammation and Allergy Volume 13 Number 177*. USA

- Christiana, F., A. Elena and Z. Nina. 2014. Superoxide Dismutase: Therapeutic Targets in SOD Related Pathology. *Scientific Journal of Biochemistry Volume 6 Number 3*. Romania
- Dai, T., G. B. Kharkwal, M. Tanaka, V. J. Bil de Arce and M. R. Humblin. 2011. Animal Model of Traumatic Wound Infections. *Journal of Virulence Volume 2 Number 4*. USA
- Danususanto, S. 2007. Peran Radikal Bebas Terhadap Beberapa Penyakit Paru. *Jurnal Kedokteran Trisakti Volume 8 Nomor 4*. Jakarta
- De La Vega, M. R., A. Krajisnik, D. D. Zhank and G. T. Wondark. 2017. Targeting NRF2 for Improved Skin Barrier Function and Photoprotection. *International Journal of Nutrients Volume 9 Number 1371*. Arizona
- Departemen Kesehatan Republik Indonesia. 2000. *Parameter Stadar Umum Ekstrak Tumbuhan Obat*. Direktorat Jendral Pengawas Obat dan Makanan. Jakarta
- Diez, C. E., V. Miguel, D. Mannerich, T. Kietzmann, P. S. Perez, S. Cadenas and S. Lamas. 2015. Antioxidant Responses and Cellular Adjustment to Oxidative Stress. *Journal of Redox Biology Elsevier Volume 6*. Spain
- Duran, N., B. Ozer, G. G. Duran, Y. Onlen and C. Demir. 2012. Antibiotic Resistance Genes and Susceptibility Patterns in Staphylococci. *Indian Journal Medical Research Number 135*. Turkey
- Dwivedi, V. and S. Tripathi. 2014. Review Study on Potential Activity of *Piper betle*. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry Volume 3 Number 4*. India
- Fowler, D. and J. M. Williams. 2008. *Manual of Canine and Feline Wound Management and Reconstruction 11th Edition*. BSAVA. UK
- Gibson, J. 2007. *Fisiologi dan Anatomi Modern untuk Perawat Edisi ke-5*. EGC. Jakarta
- Haddadin, A. S., S. A. Fappiano and P. A. Lipset. 2002. Methicillin Resistance *Staphylococcus aureus* in the Intensive Care Unit. *Journal of Post Graduated Medicine Number 78*. Baltimore
- Harismah, K. dan Chusniatun. 2016. Pemanfaatan Daun Salam (*Eugenia Polyantha*) Sebagai Obat Herbal dan Rempah Penyedap Makanan. *Jurnal Farmakologi Universitas Muhammadiyah Surakarta Volume 19 Nomor 2*. Solo

- Harris, L. G., S. J. Foster and R. G. Richards. 2002. An Introduction to *Staphylococcus aureus* and Techniques for Identifying and Qualifying *Staphylococcus aureus* Adhesins in Relation to Adhesion to Biomaterial: Review. *Journal of European Cells and Materials Volume 4*. UK
- Hasmila, I., Amaliah dan M. Danial. 2015. Efektivitas Ekstrak Daun Sirsak (*Annona muricata*) pada Mencit yang Terinfeksi Bakteri *Staphylococcus aureus*. *Prosiding Seminar Nasional Mikrobiologi Kesehatan dan Lingkungan*. Makassar
- Holmstrom, K. M., R. V. Kostov and A. T. D. Kostova. 2016. *The Multifaceted Role of Nrf2 in Mitochondrial Function*. Elsevier. Finland
- Jha, R. K., N. Garud and R. K. Nema. 2009. Excision and Incision Wound Healing Activity of Flower Head Alcoholic Extract of *Sphaeranthus indicus* Linn. In Albino Rats. *Global Journal of Pharmacology Volume 3 Number 1*. India
- Jusuf, A. A. 2009. *Histoteknika Dasar Magister Biomedik*. Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, Dicitak oleh UI Press. Depok
- Kalangi, S. J. R. 2013. Histofisiologi Kulit. *Jurnal Biomedik Volume 5 Nomor 3 Fakultas Kedokteran Universitas Sam Ratulangi*. Manado
- Kaur, S and P. Mondal. 2014. Study of Total Phenolic and Flavonoid Content, Antioxidant Activity and Antimicrobial Properties of Medicinal Plants. *Jaournal of Microbiology and Experimentation Volume 1 Issue 1*. India
- Khassaf, M., A. McArdle, C. Esanu, A. Vasilaki and R. D. Griffiths. 2003. Effect of Vitamin C Supplements on Antioxidant Defence and Stress Proteins in Human Lymphocytes and Skeletal Muscle. *Journal of Physiology*. Liverpool
- Knubel, S. A., B. Struck, G. Genrich, O. Helm, B. Spios, S. Sebens and H. Schafer. 2015. The Crosstalk between Nrf2 and TGF- β 1 in the Epithelial-Mesenchymal Transition of Pancreatic Duct Epithelial Cells. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4520686/pdf/pone.0132978.pdf> [Diakses tanggal 10 Mei 2018].
- Kumar, R. M., K. Kavitha and S. A. Dhanaraj. 2015. Role of Flavonoids in Human Nutrition as Heath Promoting Natural Chemical. *Journal of Applied Pharmacy Volume 6 Number 2*. India
- Kumar, V., A. A. Khan and K. Nagarajan. 2013. Animal Models fot The Evaluation of Wound Healing Activity. *International Bulletin of Drug Research Volume 3 Number 5*. New Delhi

- Kurdi, A. 2011. *Tanaman Herbal Indonesia*. <<https://aseranikurdi.files.wordpress.com/2011/09/tanaman-herbal.pdf>> [Diakses tanggal 13 Oktober 2017]
- Kurhalyuk, N., H. Tkachenko and K. Palczynska. 2009. Antioxidant Enzymes Profile in the Brown Trout (*Salmo trutta trutta*) with Ulcerative Dermal Necrosis. *Bull Vet Inst Pulawy Number 53*. Ukraine
- Leong, M. and L. G. Phillips. 2012. *Wound Healing*. Dalam: *Sabiston Textbook of Surgery*. Edisi ke-19. Amsterdam: Elsevier Saunders; h. 984-92
- Le Quere S., D. Lacan, B. Lemaire, J. Carlion and K. Schmitt. 2014. The Role of Superoxide Dismutation (SOD) in Skin Disorders. *Nutrafoods Springer Volume 13 Number 13*. France
- Lin Hu, M. 2011. Dietary Polyphenols as Antioxidants and Anticancer Agents. *Chang Gung Medical Journal Volume 34 Number 5*. Taiwan
- Lostapa, I. W. F. W., A. A. G. J. Wardhita, I. G. A. G.P Pelayun dan L. M. Sudimartini. 2016. Kecepatan Kesembuhan Luka Insisi yang Diberi Amoksilin dan Asam Mefenamit pada Tikus Putih. *Bulletin Veteriner Universitas Udayana Volume 8 Nomor 2*. Bali
- Macan, M., M. Kovivanas, M. Kelava and J. Loveric. 2008. Measurement of Malondialdehyde (MDA) Level in Rat Plasma After Simvastatin Treatment Using Two Different Analytical Methods. *Journal Periodicum Biologorum Volume 110 Number 1*. Croatia
- Maroon, J.C., Bost, J.W., dan Maroon, A. 2010. Natural Anti-Inflammatory Agents for Pain Relief. *International Journal of Neurology Surgery*. USA
- Mikirova, N. and R. C. Scimecca. 2016. Gene Expression Response to Ascorbic Acid in Mice Implanted with Sarcoma S180 Cells. *Journal of Translational Science Volume 2 Number 3*. USA
- Montgomery, D., and S. Kowalsky. 2011. Design And Analysis of Experiment. *John Willey an Sains Inc*.USA
- Naik, G. 2011. A Study on Surgical Site Infections Caused by *Staphylococcus aureus* with a Special Research for Metichillin Resistant Isolates. *Journal of Clinical and Diagnostic Research Volume 5 Number 3*. India
- Nurhayati, S., T. Kisnanto dan M. Syaifuddin. 2011. Superoksida Dismutase (SOD) dan Peranannya dalam Radioterapi. *Jurnal Pustek Keselamatan dan Metrologi Radiasi Batan Volume 13 Nomor 2*. Jakarta
- Pavletic, M. M. 2010. *Atlas of Small Animal Wound Management and Reconstructive Surgery*. Wiley-Blackwell. USA

- Plumb, D. C. 2008. *Veterinary Drug Handbook 6th Edition*. Blackwell Publishing. Iowa
- Pradhan, D., K. A. Suri and P. Biswasroy. 2013. Golden Heart of the Nature. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry Volume 1 Number 6*. India
- Redha, A. 2010. Flavonoid: Struktur, Sifat Antioksidatif dan Peranannya dalam Sistem Biologis. *Jurnal Belian Volume 9 Nomor 2 Politeknik Pertanian Pontianak*. Pontianak
- Santana, G. S., E. C. Dip and Fabio A. A. 2015. Methicillin Resistance *Staphylococcus aureus* and Methicillin Susceptible *Staphylococcus aureus* Cause Dermonecrosis and Bacterimia in Rats. *International Research of Microbiology Volume 6 Number 1*. Brazil
- Sayogo, W., A. D. W. Widodo dan Y. P. Dachlan. 2017. Potensi +Dalethyne terhadap Epithelisasi Luka pada Kulit Tikus yang Diinfeksi Bakteri MRSA. *Jurnal Biosains Pascasarjana Universitas Airlangga Volume 19*. Surabaya
- Sharp, P. E. and M. C. La Ragina. 2009. *The Laboratory Rat*. CRC Press. Missouri
- Sibbald, R. G., R. J. Leaper and D. Queen. 2011. Iodine for Anti Microbial in Wound Healing. *International Journal of Wound Healing Volume 2*. USA
- Smirnova, N. A., N. A. Kaidery, D. M. Hushpulian, I. I. Rakhman, A. A. Poloznikov, V. I. Tishkov, S. S. Karuppagounder, I. N. Gaisina, A. Pekec, K. V. Leyen, S. V. Kazakov, L. Yang, B. Thomas, R. R. Ratan and I. G. Gazaryan. 2016. Bioactive Flavonoids and Catechols as Hif1 and Nrf2 Protein Stabilizers - Implications for Parkinson's Disease. *International Journal of Aging and Disease Volume 7 Number 6*. Rusia
- Suzuki, S., Y. Miyachi, Y. Niwa and N Isshiki. 1989. Significance of Reactive Oxygen Species in Distal Flap Necrosis and Its Salvage with Liposomal SOD. *British Journal Plastic Surgery Volume 28 Number 42*. Japan
- Wansyah, M. A., R. L. Vifta dan S. K. Retno. 2017. Efektivitas Salep Ekstrak Daun Sirih Hijau (*Piper betle*) terhadap Lama Kesembuhan Luka pada Tikus Putih Yang Terinfeksi Bakteri *Staphylococcus aureus*. *Skripsi*. Ungaran
- Waktins, R.R., M. Z. David and R. A. Salata. 2012. Current Concepts on The Virulence Mechanisms of Meticillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of Medical Microbiology Volume 61*. USA
- Weydert, C. J. and J. J. Cullen. 2010. *Measurement od Superoxide Dismutase, Catalase and Glutathione Peroxidase in Cultured Cells and Tissue*. NIH Publisher. Iowa

Yanhendri, S. W. Y. 2012. Berbagai Bentuk Sediaan Topikal dalam Dermatologi. *Jurnal Ilmu Kesehatan Kulit dan Kelamin Fakultas Kedokteran Universitas Andalas Volume 39 Nomor 6*. Padang

Yasuda, D., M. Nakajima, A. Yuasa, R. Obata, Y. Ichimura, M. Yamamoto and T. Mashino. 2016. Synthesis of Keap1 – Phosphorylated p62 and Keap1 – Nrf2 Interaction Inhibition. *Journal of Bioorganic and Medicinal Chemistry Elsevier Volume 26*. Japan

