

BAB I

PENDAHULUAN

I.1 Latar Belakang

Saat ini, penyakit kulit di Indonesia masih relatif tinggi dan cukup signifikan. Hal tersebut dapat terjadi karena kurangnya kesadaran masyarakat terhadap lingkungan sekitar yang dapat menyebabkan penyebaran penyakit dengan cepat (Wulandari dkk., 2024). Penyakit infeksi kulit atau biasanya juga disebut sebagai penyakit menular karena dapat menginfeksi satu individu ke individu lain yang disebabkan oleh beberapa faktor seperti sosial ekonomi yang rendah, lingkungan yang tidak bersih dan perilaku yang tidak mendukung kesehatan. Penyakit ini biasanya disebabkan oleh beberapa bakteri seperti *Staphylococcus aureus*, *Propionibacterium acnes*, *Streptococcus pyogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus β hemolyticus* (Azizah dkk., 2020).

Infeksi bakteri pada kulit merupakan suatu penyakit yang terjadi akibat ketidakseimbangan antara kemampuan mikroorganisme patogen dan mekanisme pertahanan tubuh manusia (Hidayati dkk., 2019). Penyakit ini menempati posisi ketiga terbanyak di antara semua penyakit kulit (Lidjaja, 2022). Secara umum, pengobatan infeksi dapat dilakukan dengan menggunakan antimikroba seperti antibiotik (obat yang digunakan untuk mengobati infeksi bakteri). Namun, penggunaan antibiotik yang tidak tepat dapat menimbulkan beberapa masalah salah satunya resistensi antibiotik yaitu bakteri menjadi kebal yang mengakibatkan antibiotik tidak memiliki kemampuan untuk membunuh ataupun menghambat pertumbuhan bakteri (Kamri dkk., 2023).

Adapun alternatif lain yang dapat dikembangkan untuk mengobati infeksi kulit yaitu penggunaan bahan alam sebagai agen antibakteri. Pemanfaatan bahan alam sebagai obat tradisional sangat diminati karena relatif mudah didapat. Penggunaan obat tradisional menjadi semakin meningkat dan berkembang di masyarakat karena bahan obat dari alam yang tumbuh melimpah di Indonesia (Hasmila dkk., 2015). Salah satu tanaman yang memiliki aktivitas antibakteri adalah daun gatal (*Laportea decumana*). Daun gatal merupakan tanaman perdu yang tumbuh dan dapat mencapai tinggi 2 m dengan batang yang lunak, rapuh, bercabang banyak dan memiliki bulu pada permukaan daunnya. Beberapa golongan senyawa metabolit sekunder yang terdapat pada ekstrak daun gatal yang berfungsi sebagai antibakteri seperti senyawa flavonoid, saponin dan tanin. Selain itu, daun gatal juga mengandung alkaloid, glikosida, steroid/triterpenoid yang berfungsi sebagai antibakteri, antioksidan, penyembuhan luka, antikolesterol, antihiperurisemia, antihiperqlikemia, analgesik, antiinflamasi dan antidiabetik (Simaremare dkk., 2017; Mewar dkk., 2023). Selain memberikan manfaat pengobatan, metabolit sekunder ini juga dapat menyebabkan efek toksik, tetapi pada penelitian yang telah dilakukan oleh Hasan *et al* (2024), menunjukkan bahwa *L. decumana* memiliki LD₅₀ di atas 5000 mg/kg BB yang menandakan bahwa ekstrak *L. decumana* tidak menyebabkan kematian pada hewan uji yang digunakan pada penelitian tersebut.



Sediaan salep merupakan sediaan topikal yang dapat digunakan sebagai alternatif untuk formulasi ekstrak daun gatal dalam penyembuhan luka infeksi bakteri. Sediaan ini dipilih karena konsistensi atau tekstur sediaananya cocok untuk terapi penyakit kulit yang disebabkan oleh bakteri yang dapat membantu zat aktif bekerja lebih lama pada area yang terinfeksi (Naibaho dkk., 2013). Penelitian sebelumnya telah menunjukkan bahwa daun gatal memiliki aktivitas antibakteri secara in vitro (Simaremare dkk., 2017; Sukartiningsih dkk., 2019).

Saat ini, belum ada penelitian yang menggunakan ekstrak tanaman daun gatal (*L. decumana*) untuk luka infeksi secara in vivo pada tikus (*Rattus norvegicus*). Oleh karena itu, penelitian ini dilakukan untuk mengetahui aktivitas antibakteri dari ekstrak daun gatal untuk penyembuhan luka akibat infeksi bakteri dalam bentuk sediaan salep sebagai obat antibakteri.

I.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang diatas maka rumusan masalah pada penelitian ini yaitu bagaimana aktivitas antibakteri dari ekstrak daun gatal (*L. decumana*) dalam menghambat pertumbuhan bakteri pada luka tikus yang terinfeksi polimikroba?

I.3 Tujuan

Berdasarkan rumusan masalah diatas maka tujuan penelitian ini yaitu untuk mengetahui aktivitas antibakteri dari ekstrak daun gatal (*L. decumana*) dalam menghambat pertumbuhan bakteri pada luka tikus yang terinfeksi polimikroba.



BAB II

METODE PENELITIAN

II.1 Alat dan Bahan

II.1.1 Alat

Alat-alat yang digunakan pada penelitian ini yaitu *colony counter* (B-one[®]), *biopsy punch* 6mm, *cotton swab* (Onemed[®]), *microtube* 1,5 mL (Onemed[®]), mikropipet (Dragon[®]), tip mikropipet 20 μ L (Onemed[®]), tip mikropipet 1000 μ L (Onemed[®]), ose bulat, densitometer Mcfarland (Biosan[®]), autoklaf (All American[®]), incubator (Memmert[®]), cawan petri (Iwaki[®]), *Biological Safety Cabinet* (BSC) (Thermo[®]), *rotary evaporator* (Heidolph[®]), cawan porselen, Erlenmeyer (Iwaki[®]), *handscoon* (Safe Gloves[®]), vortex (VM-300[®]), jangka sorong, kompor listrik (Oxone[®]), *water bath*, tabung reaksi (Iwaki[®]), timbangan analitik (Acis[®]), toples kaca, lap kasar, lap halus, rak tabung, sendok tanduk besi dan sendok tanduk plastik, batang pengaduk, spoit 1 mL (Onemed[®]), dan spoit 10 mL (Onemed[®]).

II.1.2 Bahan

Bahan yang digunakan pada penelitian ini yaitu *aluminium foil*, *aquadest* (Onemed[®]), benang godam, biakan bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 6358, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, ekstrak daun gatal (*L. decumana*) (koleksi dari Prof. Yulia Yusrini Djabir, S.Si., MBM.Sc., M.Si., Ph.D., Apt.) , etanol 70% (Onemed[®]), *hand sanitizer* (Onemed[®]), injeksi ketamin HCl vial 50mg/10mL, kapas (Onemed[®]), kasa steril (Hexa Husada[®]), kertas perkamen, korek api, larutan normal saline 0,9% (BBraun), *Nurtrient Agar* (NA) (Himedia[®]), *Mueller Hinton Agar* (MHA) (Himedia[®]), pakan tikus, sekam, silika gel, spiritus, *tissue*, perontok bulu tikus (Veet[®]).

II.2 Metode Penelitian

II.2.1 Pembuatan ekstrak daun gatal (*L. decumana*)

Serbuk simplisia *L. decumana* ditimbang sebanyak 500 mg, dimasukkan ke dalam bejana maserasi berupa toples kaca, kemudian ditambahkan pelarut etanol 70% sampai serbuk simplisia seluruhnya terendam, lalu ditutup rapat selama 3 hari dan simpan pada suhu ruang yang terhindar dari cahaya matahari langsung. Selama proses perendaman berlangsung perlu dilakukan pengadukan sesekali. Setelah dilakukan perendaman selama 3 hari, kemudian dilakukan penyaringan menggunakan kertas saring dengan bantuan pompa vakum untuk mempercepat proses penyaringan. Hasil residu yang tersisa dari proses maserasi sebelumnya kembali direndam menggunakan etanol 70% sebanyak 3 kali. Filtrat yang diperoleh kemudian diuapkan menggunakan *rotary evaporator* untuk memperoleh ekstrak kental daun gatal (*L. decumana*) (Simaremare, 2014).



II.2.2 Pembuatan sediaan topikal ekstrak daun gatal (*L. decumana*)

Sediaan salep topikal dibuat dengan ekstrak daun gatal dengan 3 variasi konsentrasi yaitu 2%, 4%, dan 8% menggunakan basis vaselin album dengan total berat sediaan yaitu 10 gram untuk setiap formulasi. Pada konsentrasi 2% menggunakan 0,2 gram ekstrak daun gatal dan 9,8 gram vaselin album. Sementara untuk konsentrasi 4% menggunakan 0,4 gram ekstrak daun gatal dengan 9,6 gram basis vaselin album dan untuk konsentrasi 8% menggunakan 0,8 gram ekstrak daun gatal dengan 9,2 gram basis vaselin album.

II.2.3 Pembuatan suspensi polimikroba

Polimikroba digunakan sebagai model luka infeksi kronik pada hewan uji. Mikroba yang digunakan terdiri dari *S. aureus*, *P. aeruginosa* dan *S. epidermidis* yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Farmasi Universitas Hasanuddin. Pembuatan suspensi polimikroba diawali dengan peremajaan bakteri dengan cara disiapkan 3 tabung reaksi yang berisi media NA dan telah diberi penandaan. Masing-masing bakteri tersebut diremajakan dalam tabung reaksi yang berbeda dengan mengambil 1 ose biakan bakteri, lalu diinokulasikan pada masing-masing tabung reaksi sesuai dengan penandaan yang telah diberikan, kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 1 x 24 jam. Bakteri yang telah diremajakan selanjutnya dibuat dalam bentuk suspensi dengan cara menyiapkan 3 tabung reaksi yang berisi 3 mL NaCl 0,9% dan diberi penandaan. Setiap bakteri tersebut dibuat suspensi dalam tabung reaksi yang berbeda dengan mengambil 1 ose biakan bakteri, lalu dimasukkan ke dalam tabung reaksi sesuai dengan penandaan. Setelah itu, di ukur menggunakan densitometer McFarland sampai di dapatkan suspensi yang setara dengan standar McFarland 0,5.

II.2.4 Penyiapan hewan uji

Hewan yang digunakan dalam penelitian adalah tikus (*Rattus norvegicus*) dengan kondisi yang sehat sebanyak 5 ekor. berdasarkan WHO penggunaan hewan coba untuk suatu penelitian dapat menggunakan 5 hewan coba dan juga di tegaskan oleh Hamid dan Widjaja (2021) bahwa saat ini terdapat kecenderungan untuk membatasi penggunaan tikus hanya lima pada setiap kelompok percobaan tanpa menggunakan rumus Federer. Hewan uji diberikan pakan standar dan minum setiap hari dan penggantian sekam secara rutin 2 kali seminggu.

II.2.5 Pembuatan luka pada hewan uji

Sebelum dilakukan perlakuan, hewan uji sebanyak 5 ekor dianestesi menggunakan injeksi ketamin HCl yang diberikan melalui rute intraperitoneal. Setelah di anestesi menggunakan ketamin, bagian punggung tikus dicukur, lalu dioleskan dengan Veet® untuk mempermudah penghilangan bulu pada tikus. Area punggung tikus yang telah di cukur dibagi menjadi 4 bagian yaitu bagian punggung sebelah kiri dan kanan. Setelah itu, dibuat 4 luka berbentuk lingkaran diameter 6 mm pada masing-masing bagian menggunakan *biopsy punch*.



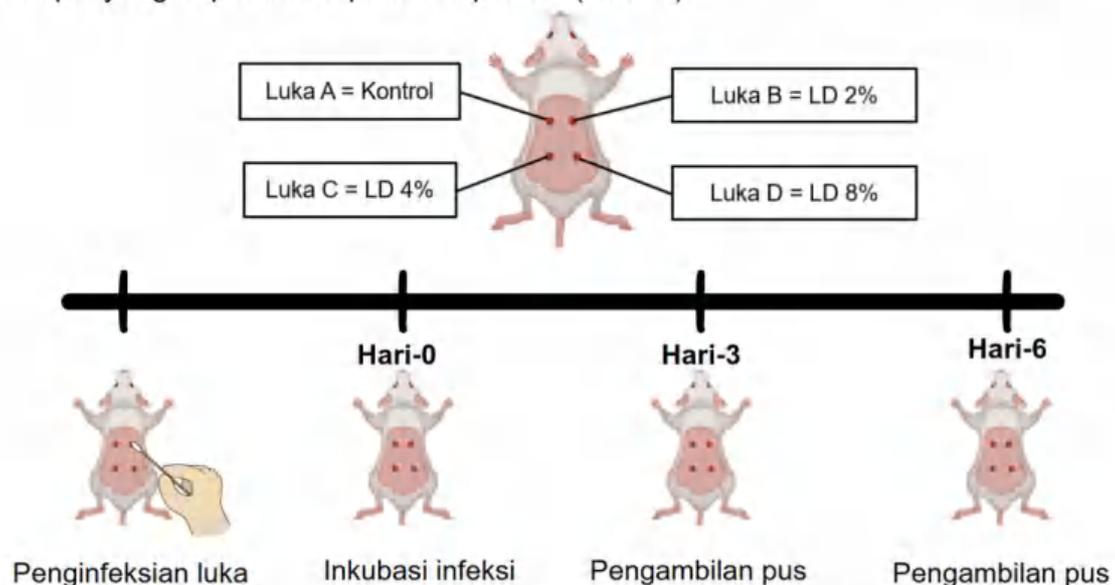
II.2.6 Perlakuan pada hewan uji

Protokol penanganan dan perlakuan hewan uji diajukan ke Komite Etik Penelitian di Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin perlu dilakukan sebelum memulai perlakuan. Protokol penelitian dapat dilihat pada gambar 1. Setiap tikus memiliki 4 kelompok dengan perlakuan yang berbeda yang terdiri dari:

1. Luka A (kontrol negatif): luka diinfeksi polimikroba kemudian dioleskan dengan basis yang digunakan.
2. Luka B (LD 2%): luka diinfeksi polimikroba kemudian dioleskan salep ekstrak *L. decumana* 2% (LD 2%).
3. Luka C (LD 4%): luka diinfeksi polimikroba kemudian dioleskan salep ekstrak *L. decumana* 4% (LD 4%).
4. Luka D (LD 8%): luka diinfeksi polimikroba kemudian dioleskan salep ekstrak *L. decumana* 8% (LD 8%).

Sediaan salep dioleskan sampai semua luka tertutupi sebanyak 10 mg menggunakan jari yang dilapisi dengan *handscoon*.

Pengambilan sampel *pus* pada luka dilakukan menggunakan *cotton swab* steril dan langsung dimasukkan pada tabung reaksi yang telah disterilkan pada hari ke-3 (fase inflamasi) dan hari ke-6 (fase proliferasi). Pada hari ke-9 (fase maturasi), kebanyakan luka hewan sudah mengering sehingga tidak dilakukan pengambilan sampel yang dapat dilihat pada lampiran 2 (tabel 4).



Gambar 1. Protokol perlakuan

II.2.7 Pengujian Aktivitas Antibakteri

Pengujian ini diawali dengan pembuatan media pertumbuhan bakteri. Pada penelitian ini digunakan *Mueller Hinton Agar* (MHA) sebagai media pertumbuhan bakteri. Setelah itu, dilakukan pengambilan sampel berupa *pus* atau nanah dari luka

erlakuan terdiri dari 5 replikasi) kemudian dimasukkan ke dalam tabung tambahkan larutan NaCl 0,9% (1:10) dan terakhir di vortex selama 30 semua nanah pada *cotton swab* tercampur. Hasil ekstraksi tersebut



dijadikan sebagai larutan stok (10^0). Pengenceran serial $10^{-1} - 10^{-6}$ dibuat dari larutan stok dalam tabung eppendorf 1,5 mL dengan pembilasan berulang 4-5 kali dan pada setiap pengenceran harus mengganti tip mikropipetnya. Kemudian, digunakan serial pengencerannya segera atau simpan dalam keadaan dingin sampai digunakan.

Selanjutnya, dilakukan percobaan dengan menandai bagian belakang cawan petri yang berisi media MHA yang telah padat dan dibagi menjadi enam sektor dengan penandaan sektor pengenceran pertama sampai terakhir untuk memberikan identifikasi yang jelas. Kemudian, aplikasikan 20 μ L alikuot dari 6 pengenceran menjadi 10-12 tetes pada setiap sektor dan biarkan plat selama 4-6 menit sampai mengering. Lalu, inkubasi pada suhu 28-37°C (sesuaikan bagaimana diperlukan mikroorganisme tertentu) selama 18-48 jam. Pengenceran dapat menghasilkan koloni yang dapat diterima yaitu 6 – 60 per sektor (Thomas dkk., 2015).

Pertumbuhan bakteri diamati dan dihitung menggunakan *colony counter*. Pengambilan sampel dilakukan sebanyak 2 kali yaitu pada hari ke-3 (kelompok fase inflamasi) dan ke-6 (kelompok fase proliferasi).

Perbandingan jumlah *colony forming unit* dalam 1 mL sampel antara hari ke-3 dan ke-6 dihitung menggunakan *colony counter* lalu dihitung menggunakan rumus (Thomas dkk., 2015):

$$n \times 5 \times 10^{d+1},$$

keterangan:

n = jumlah koloni pada 20 μ L sampel;

d = tingkat pengenceran menghasilkan koloni yang dapat dihitung

Kemudian dilakukan perhitungan log reduksi untuk mengetahui pengurangan jumlah bakteri dengan rumus (Mascarenhas dkk., 2022):

$$\text{Log reduksi} = \log N_0 - \log N$$

Keterangan:

N_0 = Jumlah bakteri awal

N = Jumlah bakteri akhir

