



**EFEK EKSTRAK ETANOL DAUN MURBEI (*Morus alba* L.)
PADA TIKUS WISTAR MODEL KONJUNGTIVITIS
OLEH *Staphylococcus aureus***

SKRIPSI

Oleh:

**Gama Wisnu Sanjaya
NIM 142010101022**

**FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS JEMBER
2018**



**EFEK EKSTRAK ETANOL DAUN MURBEI (*Morus alba* L.)
PADA TIKUS WISTAR MODEL KONJUNGTIVITIS
OLEH *Staphylococcus aureus***

SKRIPSI

Diajukan guna melengkapi tugas akhir dan memenuhi salah satu syarat
untuk menyelesaikan Program Studi Pendidikan Dokter (S1)
dan mencapai gelar Sarjana Kedokteran

Oleh:

Gama Wisnu Sanjaya

NIM 142010101022

**FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS JEMBER**

2018

PERSEMBAHAN

Skripsi ini saya persembahkan untuk:

1. Allah SWT, dengan segala rahmat dan karunia-Nya yang tak pernah henti membuat saya bersyukur akan nikmat iman dan Islam yang telah menjadi penerang dan pedoman dalam proses belajar selama ini beserta Nabi Muhammad SAW yang selalu menjadi tauladan bagi saya;
2. Orang tua tersayang, dan adik saya yang telah memberikan dukungan doa, semangat, bimbingan, kasih sayang, dan telah membesarkan mimpi-mimpi saya;
3. Guru-guru saya dari masa taman kanak-kanak hingga kuliah, karena ilmu yang diajarkan membuat saya menjadi pribadi yang bertaqwa dan berakhlak;
4. Almamater Fakultas Kedokteran Universitas Jember atas kesempatan belajar dan menjadi bagian keluarga besar didalamnya.

MOTTO

Sesungguhnya Allah tidak akan mengubah nasib suatu kaum hingga mereka
mengubah diri mereka sendiri.

(terjemahan Surat Ar-Ra'd ayat 11) *)



*) Departemen Agama Republik Indonesia. 2010. *Al- Qur'an dan terjemahan*. Bandung: CV Diponegoro

PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

nama: Gama Wisnu Sanjaya

NIM: 142010101022

menyatakan dengan sesungguhnya bahwa karya ilmiah yang berjudul "Efek Ekstrak Etanol Daun Murbei (*Morus alba* L.) pada Tikus Wistar Model Konjungtivitis oleh *Staphylococcus aureus*" adalah benar-benar hasil karya sendiri, kecuali kutipan yang sudah saya sebutkan sumbernya, belum pernah diajukan pada institusi mana pun, dan bukan karya jiplakan. Saya bertanggung jawab atas keabsahan dan kebenaran isinya sesuai dengan sikap ilmiah yang harus dijunjung tinggi.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya, tanpa ada tekanan dan paksaan dari pihak mana pun serta bersedia mendapat sanksi akademik jika ternyata di kemudian hari pernyataan ini tidak benar.

Jember, 22 Februari 2018

Yang menyatakan,

Gama Wisnu Sanjaya

NIM 142010101022

SKRIPSI

**EFEK EKSTRAK ETANOL DAUN MURBEI (*Morus alba* L.)
PADA TIKUS WISTAR MODEL KONJUNGTIVITIS
OLEH *Staphylococcus aureus***

Oleh:

Gama Wisnu Sanjaya

NIM 142010101022

Pembimbing

Dosen Pembimbing Utama : dr. Cicih Komariah, Sp. M.

Dosen Pembimbing Anggota : dr. Dini Agustina, M. Biomed.

PENGESAHAN

Skripsi berjudul “Efek Ekstrak Etanol Daun Murbei (*Morus alba* L.) pada Tikus Wistar Model Konjungtivitis oleh *Staphylococcus aureus*” karya Gama Wisnu Sanjaya telah diuji dan disahkan pada:

hari, tanggal : Kamis, 22 Februari 2018

tempat : Fakultas Kedokteran Universitas Jember

Tim Penguji:

Ketua ,

Anggota I,

dr. Enny Suswati, M. Kes
NIP 19700214 199903 2 001

dr. Elly Nurus Sakinah, M.Si
NIP 19840916 200801 2 003

Anggota II,

Anggota III,

dr. Cicih Komariah, Sp. M.
NIP 19740928 200501 2 001

dr. Dini Agustina, M. Biomed.
NIP 19830801 200812 2 003

Mengesahkan
Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Jember,

dr. Enny Suswati, M. Kes.
NIP 19700214 199903 2 001

RINGKASAN

Efek Ekstrak Etanol Daun Murbei (*Morus alba* L.) pada Tikus Wistar Model Konjungtivitis oleh *Staphylococcus aureus*; Gama Wisnu Sanjaya, 142010101022; 2018; 82 halaman; Fakultas Kedokteran Universitas Jember.

Konjungtivitis adalah inflamasi di konjungtiva, dengan tanda klinis eksudasi, infiltrasi seluler, dan dilatasi vaskular. Penyebab konjungtivitis adalah bakteri, alergi, virus, toksin, maupun penyakit sistemik. Konjungtivitis bakteri karena bakteri Gram positif seperti *S.aureus* umumnya lebih ringan daripada konjungtivitis karena bakteri Gram negatif. Konjungtivitis ringan biasanya benigna dan *self-limited* dan dapat dimonitor tanpa terapi atau mudah diterapi dengan antibiotik. Pada orang dewasa, *Staphylococcus spesies* adalah bakteri patogen tersering mengakibatkan konjungtivitis bakteri. Umumnya, konjungtivitis bakteri jarang mengalami komplikasi serius. *S. aureus* saat ini sudah banyak dilaporkan mengalami resistensi antibiotik. Antibiotik yang dilaporkan resisten adalah methicillin dan vankomisin. Penelitian sebelumnya secara *in vitro*, juga menjelaskan bahwa ekstrak daun murbei dapat menghambat pertumbuhan bakteri *S. aureus*. Tujuan umum penelitian ini adalah untuk mengetahui efek ekstrak etanol daun murbei (*Morus alba* L.) pada tikus wistar model konjungtivitis oleh *S. aureus*

Penelitian ini merupakan penelitian *true eksperimental laboratories* secara *in vivo* dengan satu kelompok kontrol negatif (tetes mata air mata artifisial cendo lyteers), satu kelompok kontrol positif (tetes mata levofloxacin 0,5%) dan empat kelompok perlakuan (tetes mata ekstrak daun murbei 45%, 55%, 65% dan 75%) dengan rancangan penelitian *pretest-posttest control group design*. Penelitian ini dilakukan di empat tempat, yaitu di Laboratorium Biokimia FK UNEJ, Laboratorium Biologi Fakultas Farmasi UNEJ, Laboratorium Kandang Hewan Coba FKH UNAIR dan Laboratorium Mikrobiologi FMIPA UNESA. Waktu yang dibutuhkan untuk penelitian ini adalah 6 bulan yaitu pada bulan September 2017 - Februari 2018. Sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah tikus wistar dengan jumlah sampel 24 ekor terdiri atas 6 kelompok dengan pengulangan setiap kelompok 4 tikus. Tikus wistar sebanyak 24 ekor dilakukan adaptasi selama 7 hari, Pada hari ke-8, dilakukan induksi konjungtivitis dengan pemberian *S. aureus* $1,5 \times 10^8$ CFU/ml sebanyak 1 tetes tiap 10 menit selama 1 jam (dibiarkan 3 hari) sampai terjadi konjungtivitis. Pada hari ke-12 sampai hari ke-19 (7 hari), diberikan perlakuan kontrol negatif, kontrol positif dan ekstrak daun murbei 45%, 55%, 65% dan 75%.

Hasil penelitian didapatkan perbaikan gejala konjungtivitis pada hari ke-17 (*posttest*) daripada hari ke-11 (*pretest*), yaitu hilangnya mata merah, radang, sekret purulen dan hilangnya edema kelopak mata. Hasil logaritma TPC *S. aureus* dari *swab* konjungtiva tikus pada hari ke-11 dari adaptasi tikus (*pretest*) pada K(-), K(+), P1, P2, P3 dan P4 berturut-turut adalah sebesar 5,70, 5,78, 5,65, 5,63, 5,84, dan 5,69 (log 10 CFU/mata). Sedangkan TPC *S. aureus* dari *swab* konjungtiva tikus pada pada hari ke-17 dari adaptasi tikus (*posttest*) pada K(-), K(+), P1, P2, P3 dan P4 berturut-turut adalah sebesar 4,07, 3,31, 3,78, 3,82, 3,74, dan 3,63 (log 10

CFU/mata). Waktu kesembuhan tikus setelah pemberian ekstrak daun murbei mengalami perbedaan hari, yaitu pada kelompok kontrol negatif sembuh pada hari ke-8, kontrol positif sembuh pada hari ke-4, perlakuan ekstrak daun murbei 45% sembuh pada hari ke-7, perlakuan ekstrak daun murbei 55% sembuh pada hari ke-6, perlakuan ekstrak daun murbei 65% sembuh pada hari ke-6 dan perlakuan ekstrak daun murbei 75% sembuh pada hari ke-5.

Hasil analisis data dari uji normalitas data *Shapiro-Wilk* dan uji homogenitas *Levene* menunjukkan nilai $p > 0,05$ yang artinya data terdistribusi normal dan memiliki varian yang sama. Karena data yang didapatkan *kontinu* (hasil logaritma), terdistribusi normal dan homogen, maka dilanjutkan dengan uji *Anova One Way*. Hasil uji *Anova One Way* didapatkan hasil signifikan pada *pretest* $p = 0,002$ dan *posttest* $p = 0,046$ ($p < 0,05$), yang artinya terdapat perbedaan yang signifikan atau nyata pada setiap perlakuan yaitu ada pengaruh konsentrasi ekstrak daun murbei terhadap penurunan jumlah koloni bakteri *S. aureus* dilanjutkan dengan uji *Post-Hoc LSD* untuk membandingkan hasil (beda nyata) dari setiap perlakuan. Hasil uji *Post-Hoc LSD* ($p < 0,05$) didapatkan pada kontrol positif berbeda signifikan dengan kontrol negatif, kelompok P1 dan kelompok P2. Pada kelompok kontrol negatif didapatkan perbedaan yang signifikan dengan kelompok P4. Uji *paired t-test* dilakukan untuk membandingkan beda nyata dari kelompok *pretest* dan kelompok *posttest*. Hasil uji *paired t-test* didapatkan hasil signifikan $p = 0,000$ ($p < 0,05$), yang berarti bahwa terdapat perbedaan nyata antara sebelum dan setelah pemberian ekstrak daun murbei. Uji statistik terhadap data yang diperoleh dilakukan dengan menggunakan program SPSS 16.0 for Windows.

Dari penelitian ini dapat disimpulkan bahwa ekstrak etanol daun murbei (*Morus alba* L.) memiliki efek menurunkan jumlah koloni bakteri *S. aureus* dan memperbaiki gejala konjungtivitis pada tikus wistar model konjungtivitis oleh *S. aureus*.

PRAKATA

Puji syukur ke hadirat Allah SWT atas segala rahmat dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “Efek Ekstrak Etanol Daun Murbei (*Morus alba* L.) pada Tikus Wistar Model Konjungtivitis oleh *Staphylococcus aureus*”. Skripsi ini diajukan guna melengkapi tugas akhir dan memenuhi salah satu syarat untuk menyelesaikan pendidikan di Fakultas Kedokteran Universitas Jember (S1) dan mencapai gelar Sarjana Kedokteran.

Penyusunan skripsi ini tidak lepas dari bantuan berbagai pihak. Oleh karena itu, penulis ingin menyampaikan terima kasih kepada:

1. dr. Enny Suswati, M. Kes., selaku Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Jember;
2. Dosen Pembimbing Utama dr. Cicih Komariah, Sp. M. dan Dosen Pembimbing Anggota dr. Dini Agustina, M. Biomed. yang telah meluangkan waktu, pikiran, dan perhatian dalam penulisan skripsi ini;
3. Dosen Penguji I dr. Enny Suswati, M.Kes. dan Dosen Penguji II dr. Elly Nurus Sakinah, M.Si. yang telah meluangkan waktu dan memberikan saran untuk skripsi ini;
4. Wakil Dekan II Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga Surabaya yang telah memberikan izin penelitian;
5. Dr. Mahanani Tri Asri, M.Si, yang telah meluangkan waktu, pikiran, dan ilmu untuk membantu skripsi ini;
6. Kedua orang tua saya, yang selalu memotivasi, mendoakan, dan membimbing saya ke arah yang lebih baik;
7. Adik saya Lendi Rangga Sadewa yang selalu memberikan semangat dan motivasi;
8. Sahabat SDN Karah 1/411 Surabaya saya Muhammad Hafid, Muhammad Nur Rohman, M. Alfian Arifandi, Robbi Habibi Malik Utomo, Robbiul Akhmad Maulana, Deny Riswandha, Oktavian Pratama dan Zacky Kurniawan Sarbini yang selalu memberikan semangat;

9. Teman seperjuangan saya Hasbi Maulana Arsyad, Bagus Aditya Ansharullah dan Ema Fawziyah Ulfah yang memberi bantuan pikiran dan semangat;
10. Relawan skripsi saya M. Faizal Akbar, M. Iqbal Hermawan, Hasbi Maulana Arsyad, Afifatun Hasanah dan Nafiys Hilmi yang telah meluangkan waktunya untuk membantu penelitian dalam skripsi ini;
11. Teman-teman angkatan 2014 yang telah menuliskan berbagai catatan tak terlupakan dalam kesejawatan ini;
12. Mbak Nuris, Mbak Lilis dan Mbak Lilik Maslian selaku Analis Laboratorium Biokimia, Mikrobiologi dan Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Jember, Bu Widi, selaku Analis Laboratorium Biologi Fakultas Farmasi Universitas Jember, Pak Supardi, selaku Pemelihara Hewan Laboratorium Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga, Mas M. Sulung, Tania, Rohma, dan mahasiswa Jurusan Biologi FMIPA Universitas Negeri Surabaya, mereka yang telah berpartisipasi dalam penelitian ini dan telah memberikan motivasi;
13. Sahabat-sahabat “Bimbingan Belajar Bapak” Ashandi Triyoga P., Prayoga Triyadi K. P., M. Iqbal Hermawan, dan M. Faizal Akbar yang telah memotivasi untuk segera menyelesaikan skripsi ini;
14. Sahabat sekaligus *partner* saya Iva Rohmawati yang memotivasi, menginspirasi, dan membantu dalam menyelesaikan skripsi ini;
15. Rekan-rekan KKN 67 Desa Curah Kalak, Kecamatan Jangkar, Situbondo yang selalu mendukung dan memberikan semangat;
16. Semua pihak yang telah membantu dalam penyelesaian skripsi ini yang tidak dapat disebut satu per satu, terima kasih atas bantuannya. Penulis juga menerima segala kritik dan saran dari semua pihak demi kesempurnaan skripsi ini. Akhir kata penulis berharap, semoga skripsi ini dapat memberikan manfaat bagi pembaca.

Jember, 22 Februari 2018

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN SAMPUL	i
HALAMAN JUDUL	ii
HALAMAN PERSEMBAHAN	iii
HALAMAN MOTTO	iv
HALAMAN PERNYATAAN	v
HALAMAN PEMBIMINGAN	vi
HALAMAN PENGESAHAN	vii
RINGKASAN	viii
PRAKATA	xi
DAFTAR ISI	xiii
DAFTAR TABEL	xv
DAFTAR GAMBAR	xvi
DAFTAR LAMPIRAN	xvii
BAB 1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	3
1.3 Tujuan Penelitian	3
1.3.1 Tujuan Umum.....	3
1.3.2 Tujuan Khusus	3
1.4 Manfaat Penelitian	4
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA	5
2.1 Daun Murbei (<i>Morus alba</i> L.)	5
2.2 Konjungtivitis	6
2.2.1 Konjungtivitis Bakteri.....	8
2.3 <i>Staphylococcus aureus</i>	10
2.3.1 Patogenitas <i>Staphylococcus aureus</i>	11
2.4 Farmakokinetika Obat Tetes Mata	12
2.4.1 Levofloxacin Tetes Mata	13
2.5 Kerangka Konsep	14
2.6 Hipotesis	15
BAB 3. METODE PENELITIAN	16
3.1 Jenis Penelitian	16
3.2 Rancangan Penelitian	16
3.3 Tempat dan Waktu Penelitian	18
3.4 Populasi dan Sampel Penelitian	18
3.4.1 Populasi	18
3.4.2 Sampel.....	18
3.4.3 Cara Pengambilan Sampel	18
3.4.4 Besar Sampel	19
3.5 Variabel Penelitian	19
3.5.1 Variabel Bebas	19

3.5.2 Variabel Terikat.....	19
3.5.3 Variabel Terkendali.....	20
3.6 Definisi Operasional	20
3.6.1 Konsentrasi Ekstrak Daun Murbei.....	20
3.6.2 Jumlah Koloni Bakteri <i>Staphylococcus aureus</i> ...	20
3.6.3 Kontrol.....	21
3.6.4 Perbaikan Gejala Konjungtivitis.....	22
3.7 Alat dan Bahan Penelitian	22
3.8 Prosedur Penelitian	23
3.8.1 Uji Kelayakan Etik.....	23
3.8.2 Persiapan (Sterilisasi Alat) dan Perizinan.....	23
3.8.3 Pembuatan Media <i>Nutrient Agar</i> (NA).....	24
3.8.4 Pembuatan Media <i>Nutrient Broth</i>	24
3.8.5 Rekultur <i>Staphylococcus aureus</i>	25
3.8.6 Pembuatan Ekstrak Daun Murbei (Maserasi) dan Tetes Mata.....	26
3.8.7 Perlakuan Hewan Laboratorium.....	26
3.8.8 Pengambilan Sampel.....	29
3.8.9 Menghitung Jumlah Bakteri Metode <i>Pour plate</i> dari <i>Swab</i> Sekret Konjungtiva Tikus.....	29
3.8.10 Pengamatan Perbaikan Gejala Konjungtivitis Tikus dan Waktu Kesembuhan Tikus yang Terkena Konjungtivitis Bakteri.....	30
3.9 Metode Pengumpulan Data	31
3.10 Alur Penelitian	33
3.11 Analisis Data	34
BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN	35
4.1 Hasil Penelitian	35
4.1.1 Analisis Data.....	40
4.2 Pembahasan	43
BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN	48
5.1 Kesimpulan	48
5.2 Saran	48
DAFTAR PUSTAKA	49
LAMPIRAN	55

DAFTAR TABEL

	Halaman
3.1 Pembagian kelompok tikus.....	27
3.2 Pengamatan gejala konjungtivitis tikus.....	31
4.1 Data TPC <i>Staphylococcus aureus</i>	35
4.2 Hasil logaritma TPC <i>Staphylococcus aureus</i>	36
4.2 Pengamatan perbaikan gejala konjungtivitis dan waktu kesembuhan (hari).....	39
4.3 Hasil uji <i>Post-Hoc LSD</i>	41

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
2.1 Daun murbei	5
2.2 Konjungtivitis bakteri.....	7
2.3 <i>Staphylococcus aureus</i> dilihat dengan mikroskop elektron perbesaran 50.000x	10
2.4 Skema kerangka konsep	14
3.1 Rancangan penelitian	17
3.1 Alur penelitian.....	33
4.1 Grafik hasil logaritma TPC <i>Staphylococcus aureus</i>	37
4.2 Pengamatan perbaikan gejala konjungtivitis tikus kelompok kontrol negatif (cendolyteers) hari ke-12 (a), hari ke-14 (b), hari ke-15 (c), dan hari ke-17 (d).....	38
4.3 <i>Staphylococcus aureus</i> dan <i>Staphylococcus epidermidis</i> dalam MSA.....	38

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
3.1 <i>Ethical Clearance</i>	54
3.2 Surat Izin Penelitian.....	56
3.3 Surat Keterangan dan Uji Determinasi Tanaman.....	57
3.4 Surat Keterangan Sehat Hewan Laboratorium.....	61
3.5 Perhitungan Dosis Ekstrak dan Dosis Hewan Coba.....	62
4.1 Data TPC <i>Staphylococcus aureus</i>	63
4.2 Tabel dan Grafik Hasil Logaritma TPC <i>Staphylococcus aureus</i>	68
4.3 Perbaikan Gejala Konjungtivitis setelah Pemberian Ekstrak Daun Murbei	69
4.4 Uji Normalitas Data <i>Shapiro-Wilk</i>	69
4.5 Uji Homogenitas <i>Lavene</i> dan Uji <i>Anova One Way</i>	70
4.6 Uji <i>Paired T-Test</i>	79
4.7 Uji <i>Post-Hoc LSD</i>	80
4.8 Dokumentasi Penelitian.....	81

BAB I. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang Masalah

Konjungtivitis adalah inflamasi di konjungtiva, dengan tanda klinis eksudasi, infiltrasi seluler, dan dilatasi vaskular (Vaughan dan Asbury, 2015). Penyebab konjungtivitis adalah bakteri, alergi, virus, toksin, maupun penyakit sistemik (Ilyas, 2014). Di Indonesia, konjungtivitis menduduki peringkat 10 besar penyakit rawat jalan terbanyak pada tahun 2009. Dari 135.749 pasien yang berkunjung ke poli mata, 99.195 (73%) adalah kasus konjungtivitis dan gangguan lain pada konjungtiva, dengan 46.480 kasus adalah laki-laki dan 52.815 kasus adalah perempuan (Kemenkes RI, 2010). Berdasarkan survey pendahuluan tahun 2012 dari penelitian Lolowang (2014) di Balai Kesehatan Mata Masyarakat Kota Manado, didapatkan 356 pasien konjungtivitis (termasuk satu dari 5 penyakit tersering dan termasuk peringkat satu penyakit infeksi tersering) dari 13.189 pasien yang datang berobat. Dan berdasarkan penelitian Tampi dan Nugroho (2011) yang dilakukan di Instalasi Catatan Medik RSUP Dr. Kariadi Semarang tahun 2010, dengan sampel penelitian 459 pasien dengan diagnosis utama konjungtivitis yang berobat di Bagian Mata RSUP Dr. Kariadi Semarang, didapatkan 80 pasien yang memenuhi kriteria inklusi penelitian, dengan 28 pasien (35%) menderita konjungtivitis bakteri dan perlu pemberian antibiotik.

Konjungtivitis yang disebabkan bakteri dapat diakibatkan oleh infeksi *S. aureus*, *Gonococcus*, *Meningococcus*, *Streptococcus pneumonia*, *Haemophilus influenza* dan *Escherichia coli* (Ilyas, 2014). *S. aureus* dapat menyebabkan konjungtivitis bakteri akut dan konjungtivitis kronik pada pasien yang berasosiasi dengan blepharitis (Feldman, 2014). Pada orang dewasa, *Staphylococcus species* adalah bakteri patogen tersering mengakibatkan konjungtivitis bakteri (Epling 2010). Konjungtivitis bakteri karena bakteri Gram positif seperti *S. aureus*, dan *Streptococcus pneumonia* umumnya lebih ringan daripada konjungtivitis karena bakteri Gram negatif. Konjungtivitis ringan biasanya benigna dan *self-limited* dan dapat dimonitor tanpa terapi atau mudah diterapi dengan antibiotik. Konjungtivitis Gram negatif disebabkan oleh bakteri *Neisseria gonorrhoeae*, *Haemophilus*

influenza, *Moraxella*, *Pseudomonas*, *Chlamydia trachomatis*, dan *Serratia marcescens*. Gram negatif menyebabkan konjungtivitis yang virulen dan menyebabkan infeksi berat dan kemungkinan perforasi mata dalam 24-48 jam infeksi. Konjungtivitis berat ini dapat menyebabkan kebutaan dan dapat menimbulkan penyakit sistemik berat. Respon seluler pada konjungtivitis bakteri akan menunjukkan predominasi neutrophil (Yeung, 2017). Umumnya, konjungtivitis bakteri dan virus adalah *self limited* dan jarang mengalami komplikasi serius (Crounau *et al*, 2010).

Staphylococcus merupakan kuman flora normal yang sering ditemukan pada selaput lendir dan kulit pada manusia. *S. aureus* dapat menginfeksi setiap alat ataupun jaringan tubuh dan mengakibatkan timbul penyakit dengan tanda-tanda khas yaitu peradangan, nekrosis dan pembentukan abses (Warsa, 2011). NLRP3 *inflammasome* diaktivasi di sel goblet (sistem pertahanan tubuh konjungtiva), ketika berhadapan dengan toksin *S. aureus*, dan akan merespon dengan mengaktivasi caspase 1 pathway, mengakibatkan produksi IL-1 β , sebuah induksi poten inflamasi. NLRP3 adalah anggota dari kompleks multi-protein yang diterminasikan sebagai NLRP3 *inflammasome* (McGilligan, 2013). Cara *S. aureus* mengakibatkan penyakit adalah dengan membentuk berbagai zat ekstraseluler dan melalui kemampuan yang dapat tersebar luas dalam jaringan (Pandia, 2017). Ada 3 jenis metabolit yang dihasilkan oleh *S. aureus*, yaitu metabolit dengan sifat enterotoksin, eksotoksin dan nontoksin (Warsa, 2011).

S. aureus saat ini sudah banyak dilaporkan mengalami resistensi antibiotik. Antibiotik yang dilaporkan resisten adalah methicillin dan vankomisin (CDC, 2016). Tingginya kasus resistensi antibiotik sebagai pilihan terapi konjungtivitis mengakibatkan pengobatan yang tidak adekuat sehingga perlu dilakukan penelitian untuk menemukan senyawa baru yang mampu menghambat pertumbuhan bakteri *S. aureus*. Indonesia adalah negara tropis dengan posisi geografis 6°LU-11°LS dan 95°BT-141°BT, terletak di khatulistiwa dan merupakan *biodiversity country* yang memiliki keanekaragaman hayati yang tinggi. Inilah yang dijadikan landasan peneliti untuk menggunakan keanekaragaman hayati alami Indonesia yang tinggi sebagai pusat perhatian penelitian di Indonesia, salah satunya adalah murbei.

Murbei (*Morus alba* L.) memiliki kandungan senyawa fitokimia aktif yang berperan sebagai antibakteri yaitu alkaloida, flavonoida, dan polifenol (Sunanto, 2009). Selain sebagai antikanker secara *in vitro*, kandungan fitokimia quercetin dan antosianin ini juga termasuk kandungan senyawa aktif yang terdapat dalam ekstrak daun murbei (*Morus alba* L.) yang berperan sebagai antibakteri dan termasuk dalam kelompok glikosida flavonoid. Glikosida flavonoid adalah senyawa fenol dengan mekanisme kerja yaitu koagulator protein (Kim *et al.*, 2000, Chen *et al.*, 2006, Dwidjoseputro, 2005). Koagulator protein yaitu gugus fenol berikatan dengan ikatan hidrogen membran sel bakteri, menyebabkan perubahan pada struktur protein. Perubahan pada struktur protein membran sel bakteri ini mengakibatkan gangguan semipermeabilitas pada membran sel bakteri, sehingga mengakibatkan gangguan pada metabolisme seluler dan berakibat pada kematian sel bakteri (Pelczar dan Chan, 2005).

Secara *in vitro*, pertumbuhan bakteri *S. aureus*, *Escherichia coli*, *Shigella dysenteriae*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella pullorum*, *Bacillus cereus*, dan *Bacillus subtilis* mampu dihambat oleh ekstrak daun murbei (*Morus alba* L.) (Hastuti *et al.*, 2012, Jurian *et al.*, 2016, Musawwir, 2014). Berdasarkan penelitian Hastuti *et al.* (2012) secara *in vitro*, dari konsentrasi ekstrak etanol daun dan buah murbei (*Morus alba* L.) 5%, 15%, 25%, 35%, 45%, 55%, 65%, 75%, 85% dan 95%, didapatkan hasil penelitian bahwa konsentrasi ekstrak daun dan buah yang paling efektif dalam menghambat pertumbuhan *S. aureus* ialah 85%, dengan diameter zona hambat berturut-turut adalah 4,5125 dan 7,5000, sedangkan konsentrasi ekstrak daun dan buah murbei (*Morus alba* L.) yang paling efektif dalam menghambat pertumbuhan *Shigella dysenteriae* berturut-turut adalah 95% (diameter zona hambat 2,7250) dan 85% (diameter zona hambat 5,0750).

Pada penelitian ini menggunakan etanol sebagai proses ekstraksi daun murbei dibandingkan akuades dan menggunakan ekstrak daun murbei dibandingkan ekstrak batang atau ekstrak buah murbei, karena ekstrak dengan etanol menunjukkan kandungan senyawa fenol dan flavonoid yang lebih tinggi dibandingkan ekstrak dengan akuades, dengan urutan kandungan senyawa fenol yang tertinggi adalah ekstrak daun, diikuti yang lebih rendah adalah ekstrak buah,

dan yang terendah adalah ekstrak batang dan urutan kandungan flavonoid yang tertinggi adalah ekstrak daun, diikuti yang lebih rendah adalah ekstrak batang dan yang terendah adalah ekstrak buah. Aktivitas antioksidan dari ekstrak dengan etanol juga lebih kuat daripada ekstrak dengan akuades dengan urutan yang tertinggi adalah ekstrak daun, diikuti yang lebih rendah adalah ekstrak buah, dan yang terendah adalah ekstrak batang. Selain itu, ekstrak dengan etanol menunjukkan aktivitas antimikroba sedang, sedangkan ekstrak dengan akuades menunjukkan aktivitas antimikroba lemah (Wang *et al.*, 2012). Sedangkan pelarut ekstrak etanol daun murbei adalah akuades (Hastuti *et al.*, 2012). Pada penelitian ini, juga menggunakan *S. aureus* $1,5 \times 10^8$ CFU/ml sebagai induksi konjungtivitis secara topikal pada tikus wistar (Manek, 2017)

Berdasarkan tingginya kasus konjungtivitis, kasus resistensi antibiotik terhadap *S. aureus*, dan kandungan ekstrak daun murbei sebagai antibakteri, peneliti ingin mengetahui tentang efek ekstrak etanol daun murbei (*Morus alba* L.) pada tikus wistar model konjungtivitis oleh *S. aureus*.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang yang telah diuraikan di atas, maka dapat dirumuskan beberapa masalah, yaitu:

- a. Apakah terdapat efek ekstrak etanol daun murbei (*Morus alba* L.) terhadap penurunan jumlah koloni bakteri *S. aureus* pada tikus wistar model konjungtivitis oleh *S. aureus*?
- b. Apakah terdapat efek ekstrak etanol daun murbei (*Morus alba* L.) terhadap perbaikan gejala konjungtivitis pada tikus wistar model konjungtivitis oleh *S. aureus*?

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan Umum

- a. Untuk mengetahui efek ekstrak etanol daun murbei (*Morus alba* L.) pada tikus wistar model konjungtivitis oleh *S. aureus*.

1.3.2 Tujuan Khusus

- a. Untuk mengetahui adanya penurunan jumlah koloni bakteri *S. aureus* setelah pemberian ekstrak daun murbei (*Morus alba* L) secara topikal.
- b. Untuk mengetahui adanya perbaikan gejala konjungtivitis setelah pemberian ekstrak daun murbei (*Morus alba* L.) secara topikal terhadap tikus Wistar.

1.4 Manfaat Penelitian

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan beberapa manfaat, yaitu:

- a. Memperoleh tambahan pengetahuan mengenai efek ekstrak etanol daun murbei (*Morus alba* L.) pada tikus wistar model konjungtivitis oleh *S. aureus*, yang dapat dipergunakan oleh pengguna yang berkepentingan dengan ilmu ini,
- b. Memberikan alternatif senyawa penghasil antibakteri yang berasal dari tumbuhan murbei (*Morus alba* L.) dan dapat membantu para peneliti di bidang farmakologi untuk mengaplikasikan senyawa metabolit sekunder pada murbei (*Morus alba* L.) sebagai antibakteri dan bahan obat alami terutama dalam menghambat pertumbuhan *S. aureus* sebagai penyebab konjungtivitis pada model tikus Wistar.

BAB II. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Daun Murbei (*Morus alba* L.)

Daun murbei (*Morus alba* L.) memiliki kandungan isoquersetin, asam amino, vitamin (A, B1, C. dan karoten), asam folat, adenin, zinc, choline, copper, benzaidehide, benzyl alcohol, phytoestrogens, alfa-, beta-hexenal, cis-lamda-hexenol, beta-sitosterol, cis-betahexenol, asam fumarat, asam klorogenik, asam formyltetrahydrofolik, ecdysterone, aceto'ne, butylamine, moracetin, eugenol, inokosterone, scopoletin, linalool, trigonelline, rutin, scopolin, lupeol, dan mioinositol. (BPOM RI, 2010). Daun murbei bisa dilihat pada Gambar 2.1.



Gambar 2.1 Daun murbei (Sumber: BPOM RI, 2010)

Daun murbei (*Morus alba* L.) selama ini berguna sebagai pakan untuk ulat sutera, sedangkan kandungan antosianin dalam buah murbei (*Morus alba* L.) cukup tinggi yaitu sekitar 147.68 sampai 2725.46 mg/100 g (Liu, 2004). Selain sebagai antikanker secara *in vitro*, kandungan fitokimia quercetin dan antosianin ini juga termasuk kandungan senyawa aktif yang terdapat dalam ekstrak daun murbei (*Morus alba* L.) yang berperan sebagai antibakteri dan termasuk dalam kelompok glikosida flavonoid. Glikosida flavonoid adalah senyawa fenol dengan mekanisme kerja yaitu koagulator protein (Kim *et al.*, 2000, Chen *et al.*, 2006, Dwidjoseputro, 2005). Koagulator protein yaitu gugus fenol berikatan dengan ikatan hidrogen membran sel bakteri, menyebabkan perubahan pada struktur protein. Perubahan pada struktur protein membran sel bakteri ini mengakibatkan gangguan semipermeabilitas pada membran sel bakteri, sehingga mengakibatkan gangguan

pada metabolisme seluler dan berakibat pada kematian sel bakteri (Pelczar dan Chan, 2005). Senyawa fitokimia antosianin yang terkandung dalam ekstrak ini akan mempunyai efek toksisitas rendah, sehingga bisa menurunkan resiko stroke, resiko penyakit jantung koroner, mempunyai aktivitas antikarsinogen, mempunyai efek *anti-inflammatory*, dan dapat memperbaiki ketajaman mata (JEFCA, 2006).

Murbei (*Morus alba* L.) memiliki kandungan senyawa fitokimia aktif yang berperan sebagai antibakteri yaitu alkaloida, flavonoida, dan polifenol (Sunanto, 2009). Secara *in vitro*, pertumbuhan bakteri *S. aureus*, *Escherichia coli*, *Shigella dysenteriae* *Salmonella thyphimurium*, *Salmonella entertidis*, *Salmonella pullorum*, *Bacillus cereus*. dan *Bacillus subtilis* mampu dihambat oleh ekstrak daun murbei (*Morus alba* L.) (Hastuti *et al.*, 2012, Jurian *et al.*, 2016, Musawwir, 2014).

Berdasarkan penelitian sebelumnya secara *in vivo*, pengobatan ekstrak daun murbei (*Morus alba* L.) dengan dosis 300 dan 2000 mg/kgBB selama 14 hari, tidak didapatkan kematian tikus, perubahan perilaku tikus, dan tidak membahayakan ketika tertelan pada tikus dan menunjukkan aktivitas antibakteri terhadap *S. aureus*. Binatang dengan dosis tertinggi, menurunkan MCV dan MCHC yaitu meningkatkan aktivitas serum alkalin fosfatase. Pengobatan ekstrak 300 dan 2000 mg/kgBB ada penurunan angka leukosit, penurunan persentase limfosit dan peningkatan proporsi sel segmental. Histopatologi organ tikus yang diobati menggunakan ekstrak murbei 2000 mg/kg memperlihatkan turgiditas tubulus kontortus ginjal, adanya infiltrasi leukosit pada vena sentribuler hati dan tingginya penyebaran cairan putih limpa (Oliveira, 2015).

2.2 Konjungtivitis

Konjungtivitis termasuk mata merah visus normal dan kotor atau sekret. Jika terkena kornea, bisa juga diikuti oleh konjungtivitis dan membahayakan penglihatan (Jawetz *et al.*, 2008). Konjungtivitis adalah radang pada konjungtiva dengan cara menutupi bola mata dan belakang kelopak mata. Konjungtivitis ini dapat dibedakan menjadi bentuk akut ataupun kronis. Penyebab konjungtivitis adalah bakteri, alergi, virus, toksin, maupun penyakit sistemik (Ilyas, 2014). Konjungtivitis bakteri bisa dilihat pada Gambar 2.2.



Gambar 2.2 Konjungtivitis bakteri (Sumber: Dahl, 2009)

Konjungtivitis adalah inflamasi di konjungtiva, dengan tanda klinis eksudasi, infiltrasi seluler, dan dilatasi vaskular (Vaughan dan Asbury, 2015). Di Indonesia, konjungtivitis menduduki peringkat 10 besar penyakit rawat jalan terbanyak pada tahun 2009. Dari 135.749 pasien yang berkunjung ke poli mata, 99.195 (73%) adalah kasus konjungtivitis dan gangguan lain pada konjungtiva, dengan 46.480 kasus adalah laki-laki dan 52.815 kasus adalah perempuan (Kemenkes RI, 2010). Pada praktik dokter umum, paling tidak ditemukan kasus konjungtivitis setiap minggunya dan satu dari delapan siswa usia sekolah dasar terkena konjungtivitis setiap tahunnya (Oliver, 2009).

Gambaran klinis yang ditemukan pada pasien konjungtivitis yaitu hiperemi pada konjungtiva bulbi (injeksi konjungtiva), adanya eksudat dengan sekret lebih nyata pada pagi hari, adanya lakrimasi, pada bagian atas kelopak mata tampak menggantung (*pseudoptosis*) terlihat seolah akan tertutup akibat konjungtiva membengkak dan bagian atas sel-sel konjungtiva radang, flikten pada mata yaitu perasaan seperti ada benda asing, membran, granulasi, pseudomembran, folikel, hipertrofi papil, dan adenopati preaurikular. Pada reaksi konjungtivitis karena virus, biasanya akan terbentuk folikel di konjungtiva. Bentuk pupil dan bilik mata adalah normal (Ilyas, 2014).

Konjungtivitis termasuk mata merah visus normal dan kotor atau sekret. Sekret adalah produk kelenjar, dimana di konjungtiva bulbi akan dikeluarkan oleh sel goblet. Pada konjungtivitis, sekret yang terdapat pada konjungtiva bulbi bisa bersifat: *purulen*, oleh bakteri; *hiperpurulen*, disebabkan gonokok atau meningokok; *air*, karena infeksi virus atau alergi; *mukoid*, oleh alergi atau vernal serta *serous*, oleh adenovirus (Ilyas, 2014).

Pada sekret konjungtiva bulbi, bisa dilakukan pemeriksaan sitologik, yaitu dengan pulasan Giemsa yang bertujuan untuk menetapkan jenis dan morfologi sel. dan pulasan Gram yang bertujuan untuk mengidentifikasi bakteri, Hasil dari pemeriksaan sitologik ini dapat digunakan untuk mengetahui penyebab yang terdapat pada kandungan sekret dari konjungtiva bulbi seperti ditemukan: *leukosit*, *polimorfonuklear* oleh bakteri; *limfosit*, *monosit* atau sel yang berisi nukleus dengan sedikit plasma, maka infeksi ini kemungkinan disebabkan virus; *eosinofil*, *basofil* disebabkan oleh alergi; *sel raksasa multinuklear* oleh herpes; *sel leber – makrofag* raksasa oleh trakoma; Keratinisasi dengan filament oleh pemfigus atau *dry eye*, dan Badan Guarneri eosinofilik oleh vaksinia (Ilyas, 2014).

2.2.1 Konjungtivitis Bakteri

Konjungtivitis bakteri adalah infeksi pada konjungtiva, yang meluas dari bagian belakang kelopak mata (konjungtiva tarsal dan palpebral) ke fornises/forniks, dan secara global (bulbar konjungtiva) sampai bergabung dengan kornea di limbus (Feldman, 2014). Konjungtivitis yang disebabkan bakteri dapat diakibatkan oleh infeksi *Gonococcus*, *Meningococcus*, *S. aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* dan *Escherichia coli* (Ilyas, 2014). Penyebab konjungtivitis bakteri tergantung dari geografi dan usia, tetapi yang paling sering ditemukan adalah adalah *Staphylococcus*, *Haemophilus*, *Streptococcus*, *Pseudomonas*, *Corynebacterium*, dan *Moraxella* spesies (Yeung, 2017)

Konjungtivitis bakteri akut terutama disebabkan oleh *S. aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, and *Haemophilus influenzae*. Konjungtivitis kronik terutama disebabkan oleh *Chlamydia trachomatis*. *S. aureus* dan *Moraxella lacunata* bisa juga menyebabkan konjungtivitis kronik pada pasien yang berasosiasi dengan blepharitis (Feldman, 2014).

Penyebab konjungtivitis bakteri adalah mikroorganisme Gram positif dan Gram negatif. Konjungtivitis yang tersering disebabkan oleh bakteri Gram positif yaitu *S. aureus*, *Staphylococcus epidermidis*. *Streptococcus pneumoniae*, dan *Streptococcus viridians*. Sedangkan penyebab konjungtivitis oleh bakteri Gram negatif yaitu *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Serratia marcescens*,

Proteus, *Enterobacter*, dan *Pseudomonas* spesies (Afjeiee *et al.*, 2013; Oliver *et al.*, 2009). Bakteri yang paling sering menyebabkan konjungtivitis bakteri di Amerika Serikat adalah *S. aureus*, *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Moraxella catarrhalis* (CDC, 2016), dimana *S. aureus* adalah bakteri penyebab konjungtivitis yang paling sering di dunia (Mannis dan Plotnik, 2005), dan *Staphylococcus spesies*, adalah bakteri yang paling patogen menyebabkan konjungtivitis bakteri pada orang dewasa, diikuti oleh *Streptococcus pneumoniae* dan *Haemophilus influenza* yang juga patogen pada orang dewasa dan anak-anak. Selain itu, *Moraxella catarrhalis* juga sering menyebabkan konjungtivitis pada anak-anak (Epling, 2010).

Konjungtivitis bakteri karena bakteri Gram positif seperti *S. aureus*, dan *Streptococcus pneumonia* umumnya lebih ringan daripada konjungtivitis karena bakteri Gram negatif. Konjungtivitis ringan biasanya benigna dan *self-limited* dan dapat dimonitor tanpa terapi atau mudah diterapi dengan antibiotik. Konjungtivitis Gram negatif disebabkan oleh bakteri *Neisseria gonorrhoeae*, *Haemophilus influenza*, *Moraxella*, *Pseudomonas*, *Chlamydia trachomatis*, dan *Serratia marcescens*. Gram negatif menyebabkan konjungtivitis yang virulen dan menyebabkan infeksi berat dan kemungkinan perforasi mata dalam 24-48 jam infeksi. Konjungtivitis berat ini dapat menyebabkan kebutaan dan dapat menimbulkan penyakit sistemik berat. Respon seluler pada konjungtivitis bakteri akan menunjukkan predominasi neutrophil (Yeung, 2017)

Mikroba tersebut dapat memberikan gejala sekret muko-purulen dan purulen, kemosis konjungtiva, edema kelopak, kadang-kadang disertai keratitis dan blefaritis. Konjungtivitis bakteri ini mudah menular, pada satu mata ke mata sebelahnya dan menyebar ke orang lain melalui benda yang dapat menyebarkan kuman. Terdapat 2 bentuk konjungtivitis akut (dapat sembuh \pm 14 hari) dan biasanya sekunder terhadap penyakit palpebra / obstruksi duktus nasolakrimalis (Ilyas, 2014).

Tanda dan gejala konjungtivitis bakteri, selain injeksi dan edematous (radang) konjungtiva, meliputi hal berikut: *follicles* adalah tanda infeksi virus okular, bisa juga terjadi dengan konjungtivitis alergi atau hipersensitif kronik; *papila* pada

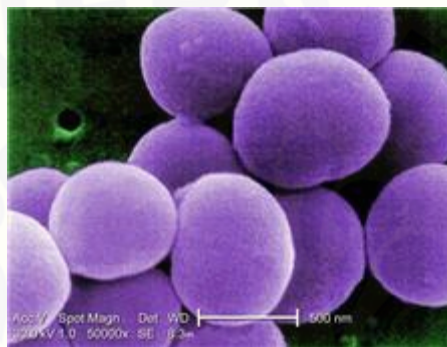
injeksi konjungtiva tarsal, juga terlihat pada konjungtivitis virus dan alergi okular; *discharge*: lebih purulen daripada konjungtivitis virus, dengan lebih banyak masalah (umumnya putih, hijau, atau kuning lendir) dari margin kelopak mata dan kesulitan yang lebih besar untuk membungkam kelopak mata terbuka setelah tidur; Pasien mungkin akan terbangun dengan mata terpejam “tertutup”; *kelenjar getah bening preauricular* yang membesar: umumnya pada konjungtivitis virus dan tidak biasa pada konjungtivitis bakteri, walaupun ditemukan pada konjungtivitis bakteri parah yang disebabkan oleh *Neisseria gonorrhoeae*; *edema kelopak mata*: sering hadir dalam konjungtivitis bakteri, namun ringan dalam banyak kasus, edema kelopak mata yang parah dengan adanya cairan purulen yang berlebihan menimbulkan kecurigaan infeksi *Neisseria gonorrhoeae* (Yeung, 2017).

Permukaan jaringan mata dan adneksa mata dikolonisasi oleh kuman flora normal seperti *Staphylococcus*, *Streptococcus*, dan *Corynebacterium*. Perubahan pada sistem pertahanan tubuh host, titer bakteri atau jenis bakteri dapat menyebabkan infeksi klinik. Perubahan pada flora juga dapat merupakan hasil dari kontaminasi eksternal (contoh: pemakaian lensa kontak, berenang), penggunaan antibiotik topikal/sistemik, penyebaran lokasi infeksius yang berdekatan (contoh: menggosok mata). Sistem pertahanan tubuh utama melawan infeksi adalah lapisan epitel yang menutupi konjungtiva. *Disruption* dari barrier dapat menyebabkan infeksi. Sistem pertahanan tubuh kedua adalah mekanisme hematologi imun yang dilakukan oleh vaskulatur konjungtiva, *tear film immunoglobulins*, lisozim dan aksi pembilasan dari lakrimasi dan *blinking* (Yeung, 2017).

Konjungtivitis bakteri sangat menular. Sebagian besar bakteri yang menyebabkan konjungtivitis menyebar melalui kontak langsung dari tangan terkontaminasi langsung ke tangan yang terkontaminasi. Orang bisa terkena konjungtivitis hanya dengan menyentuh atau menggunakan sesuatu yang telah disentuh atau digunakan oleh orang yang terinfeksi. Hal ini juga dapat menyebar dengan tetesan saluran pernapasan besar. Konjungtivitis bakteri jarang terjadi pada anak-anak di atas usia 5 tahun (CDC, 2016). Umumnya, konjungtivitis bakteri dan virus adalah *self limited* dan jarang mengalami komplikasi serius (Crounau *et al*, 2010).

1.3 *Staphylococcus aureus*

Asal kata Stafilokokus adalah *staphyle*, artinya adalah sekumpulan buah anggur dan kokus, artinya adalah benih bulat (Warsa, 2011). Dari Rosenbach (1884), klasifikasi *S. aureus* yaitu: Domain : Bacteria, Kerajaan : Eubacteria, Filum : Firmicutes, Kelas : Bacilli, Ordo : Bacillales, Famili : Staphylococcaceae, Genus : *Staphylococcus*, Spesies : *aureus*. Nama binomialnya adalah *S. aureus*. Bakteri *S. aureus* yang dilihat dengan mikroskop elektron perbesaran 50.000x bisa dilihat pada Gambar 2.3.



Gambar 2.3 *Staphylococcus aureus* dilihat dengan mikroskop elektron perbesaran 50.000x (Sumber: CDC, 2011)

S. aureus adalah bakteri Gram positif dengan bentuk bulat yang memiliki diameter 0,7-1,2 μm , fakultatif anaerob, terdiri dari kelompok-kelompok dengan susunan tidak teratur menyerupai buah anggur, tidak bergerak dan tidak membentuk spora. *S. aureus* tumbuh dengan suhu optimum 37 °C, tetapi pigmen terbaik akan terbentuk di suhu kamar (20-25 °C). Koloni pada perbenihan padat berwarna abu-abu sampai kuning keemasan, berbentuk bundar, halus, menonjol, dan berkilau. Kapsul polisakarida maupun selaput tipis yang dimiliki oleh *S. aureus* dengan mekanisme kerja untuk virulensi bakteri dihasilkan oleh lebih dari 90% isolat klinik. *S. aureus* menyebabkan bermacam derajat hemolisis, ataupun kadang disebabkan oleh stafilokokus dengan spesies yang lain (Jawetz *et al.*, 2008).

1.3.1 Patogenitas *Staphylococcus aureus*

S. aureus termasuk satu dari beberapa mikroorganisme patogen berbahaya. Penyebaran infeksi yang disebabkan *S. aureus* bisa dengan kontak terhadap pasien

karier *S. aureus*, kontak terhadap nanah dari luka pasien yang terinfeksi *S. aureus*, kontak dengan kulit orang yang terinfeksi *S. aureus*, serta kontak dengan barang-barang, seperti handuk, seprei, pakaian, dan alat pencukur jenggot orang yang terinfeksi *S. aureus* (Pandia, 2017).

Staphylococcus merupakan kuman flora normal yang sering ditemukan pada selaput lendir dan kulit pada manusia. *S. aureus* dapat menginfeksi setiap alat ataupun jaringan tubuh dan mengakibatkan timbul penyakit dengan tanda-tanda khas yaitu peradangan, nekrosis dan pembentukan abses (Warsa, 2011). NLRP3 *inflammasome* diaktivasi di sel goblet (sistem pertahanan tubuh konjungtiva), ketika berhadapan dengan toksin *S. aureus*, dan akan merespon dengan mengaktivasi caspase 1 pathway, mengakibatkan produksi IL-1 β , sebuah induksi poten inflamasi. NLRP3 adalah anggota dari kompleks multi-protein yang diterminasikan sebagai NLRP3 *inflammasome* (McGilligan, 2013). *S. aureus* yang patogen bersifat invasif, menyebabkan hemolisis, membentuk koagulase dan pigmen kuning emas, mencairkan gelatin, dan mampu meragikan manitol (Anonim, 2017). Cara *S. aureus* mengakibatkan penyakit adalah dengan membentuk bermacam zat ekstraseluler dan melalui kemampuan yang dapat tersebar luas di jaringan (Pandia, 2017). Ada 3 jenis metabolit yang dihasilkan oleh *S. aureus*, yaitu metabolit dengan sifat enterotoksin, eksotoksin dan nontoksin. Yang termasuk metabolit nontoksin adalah antigen permukaan, koagulase, hialuronidase, fibrinolisin, gelatinase, protease, lipase, tributirinase, fosfatase dan katalase. Metabolit eksotoksin terdiri dari hemolisin (jenis alfa, beta dan delta), toksin eksfoliatif, sitotoksin dan leukosidin (Warsa, 2011).

1.4 Farmakokinetika Obat Tetes Mata

Farmakokinetika adalah ruang lingkup farmakologi yang menjelaskan tentang nasib obat dalam tubuh yang terdiri dari absorpsi, distribusi, metabolisme, dan ekskresinya (ADME). Tetes mata, tetes telinga, salep merupakan obat topikal yaitu obat yang sifatnya lokal (Sanjoyo, 2017).

Pada penelitian ini digunakan bentuk sediaan obat tetes mata (obat topikal) adalah karena memiliki kelebihan yaitu adekuatnya konsentrasi obat yang dapat

dicapai di segmen depan mata dengan tanpa terjadi efek yang tidak diharapkan pada sistem tubuh yang lain (Liesegang *et al.*, 2001). Formulasi dengan sediaan obat tetes mata ini adalah kontak dengan mata singkat, bahan aktif terlarut atau tersuspensi (Dhadhang, 2013).

Kekurangan atau keterbatasan dalam bentuk sediaan obat tetes mata (obat topikal) ini adalah efektifitas waktu dan volume kontak obat dengan permukaan bola mata. Dari sejumlah obat topikal yang diteteskan, hanya sekitar 20% saja dapat tertahan oleh kelopak mata dan setelah mata berkedip akan *cul-de-sac*. Contohnya jika dilakukan peneteskan dengan dosis 50 µg (volume 1 tetes obat tetes mata pada umumnya), hanya sekitar 10 µg saja yang dapat tertahan di permukaan bola mata. Setelahnya di dalam air mata pada permukaan mata yang sehat, kurang lebih 16% per menit secara cepat volume obat akan menurun. Pada obat tetes yang merangsang refleks air mata, penurunan volume obat akan lebih banyak terjadi. Pada jenis obat dengan absorpsi lambat, setelah 4 menit peneteskan, 50% obat bisa tertahan di air mata namun setelah 10 menit, hanya 17% saja yang tertahan peneteskan (Liesegang *et al.*, 2001).

Kekurangan lain obat tetes mata dengan bentuk air ini adalah karena gerakan pelupuk mata bisa menekan keluar dari saluran konjungtiva. Dengan peningkatan viskositas dari tetes mata, penyebaran bahan aktif dengan lebih baik lagi di dalam cairan bisa tercapai dan waktu kontak bisa lebih lama (Dhadhang, 2013).

Ciri-ciri obat tetes mata (topikal) yang tidak mengiritasi permukaan bola mata ini memiliki pH fisiologis (+ 7,4) dan bebas dari iritan dan bersifat isotonis,. Sebaliknya ciri-ciri obat tetes mata (topikal) yang dapat mengiritasi dan merangsang refleks air mata adalah obat yang memiliki pH yang tidak fisiologis, mengandung iritan (seperti bahan pengawet) dan bersifat hiper/hipotonis, (Liesegang *et al.*, 2001).

2.4.1 Levofloxacin Tetes Mata

Levofloxacin tetes mata adalah antibiotik topikal generasi terbaru dari kelas fluoroquinolon. Dibandingkan dengan fluoroquinolon topikal generasi terdahulu, levofloxacin bisa mencapai konsentrasi tertinggi dan bisa dipertahankan pada

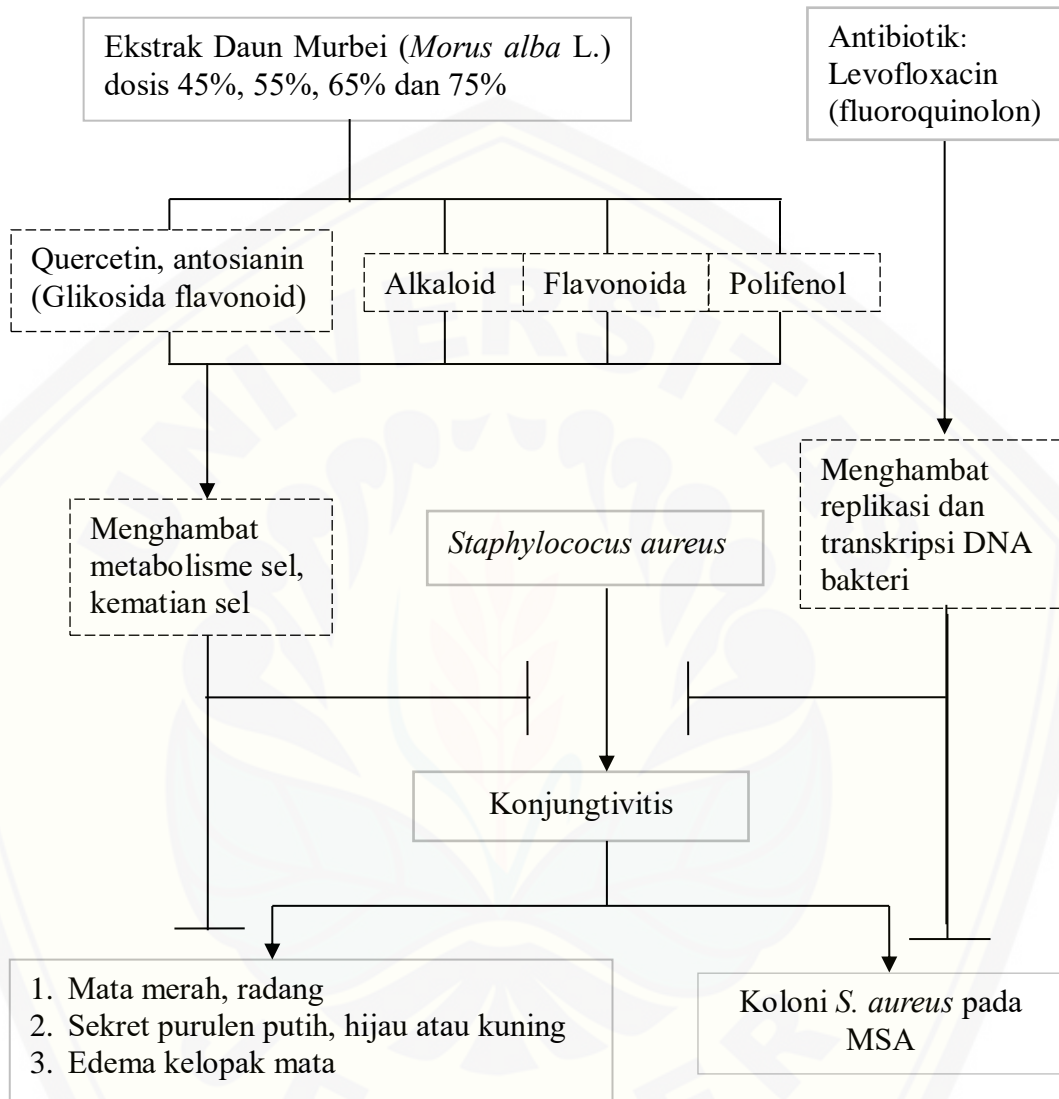
jaringan air mata dan mata dan penetrasi levofloxacin lebih baik dalam bilik anterior. Levofloxacin dan generasi fluoroquinolon topikal terbaru memiliki mekanisme ganda dalam aktivitas bakterisidalnya yakni menghambat DNA gyrase dan topoisomerase IV, sehingga resistensi bakteri rendah. Levofloxacin topikal aman dan efektif dalam terapi konjungtivitis bakterial (Tano, 2008).

Levofloxacin efektif untuk bakteri Gram positif dan Gram negatif (termasuk anaerob) dan bakteri atipikal Chlamydia pneumonia dan Mycoplasma pneumonia. Mekanisme kerjanya adalah dengan menghambat DNA-gyrase, yaitu suatu topoisomerase tipe-II sehingga menghambat replikasi dan transkripsi DNA bakteri (Ikapharmindo, 2014).

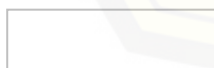
Dalam penelitian ini digunakan Levofloxacin 0,5% tetes mata 5 ml. Indikasinya adalah untuk pengobatan topikal infeksi mata eksternal seperti konjungtivitis karena mikroorganisme. Dosisnya 3 kali sehari, 1 tetes. Kontraindikasinya adalah hipersensitivitas terhadap kuinolon, dengan reaksi efek samping obat berupa iritasi mata dan kelopak mata gatal (Ferron, 2017).

2.5 Kerangka Konsep

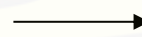
Skema kerangka konsep dapat dilihat pada Gambar 2.4.



Keterangan:



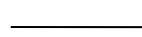
: diteliti



: berpengaruh



: tidak diteliti



: menghambat

Gambar 2.4 Skema kerangka konsep

Berdasarkan skema kerangka konsep pada Gambar 2.4, yang diteliti dalam penelitian ini adalah ekstrak daun murbei (*Morus alba* L.) 45%, 55%, 65% dan 75%, antibiotik levofloxacin (fluoroquinolon), *S. aureus*, konjungtivitis meliputi penurunan koloni *S. aureus* pada MSA dan perbaikan gejala konjungtivitis yaitu mata merah, radang, sekret purulen putih, hijau atau kuning, dan edema kelopak mata, sedangkan yang tidak diteliti dalam penelitian ini adalah senyawa antibakteri ekstrak daun murbei yaitu alkaloid, flavonoid, polifenol, quercetin dan antosianin, cara kerja senyawa antibakteri ekstrak daun murbei dan antibiotik levofloxacin sebagai antibakteri.

Pengobatan konjungtivitis dengan ekstrak daun murbei (*Morus alba* L.) 45%, 55%, 65% dan 75% dan kontrol positif yaitu antibiotik levofloxacin. Ekstrak murbei memiliki kandungan senyawa antibakteri alkaloid, flavonoid, dan polifenol. Sedangkan ekstrak daun murbei 45%, 55%, 65% dan 75% memiliki kandungan senyawa antibakteri quercetin dan antosianin yang termasuk glikosida flavonoid, dengan cara kerja menghambat metabolisme sel, kematian sel. Sedangkan cara kerja antibiotik levofloxacin sebagai antibakteri adalah menghambat replikasi dan transkripsi DNA bakteri. Ekstrak daun murbei (*Morus alba* L.) 45%, 55%, 65% dan 75% dan antibiotik levofloxacin akan menghambat gejala konjungtivitis dan menghambat koloni *S. aureus* pada MSA.

2.6 Hipotesis

Hipotesis dari penelitian ini adalah:

- a. Ekstrak etanol daun murbei (*Morus alba* L) memiliki efek dapat menurunkan jumlah koloni bakteri *S. aureus* setelah pemberian ekstrak daun murbei (*Morus alba* L) secara topikal.
- b. Ekstrak etanol daun murbei (*Morus alba* L) memiliki efek dapat memperbaiki gejala konjungtivitis setelah pemberian ekstrak daun murbei (*Morus alba* L.) secara topikal terhadap tikus Wistar.

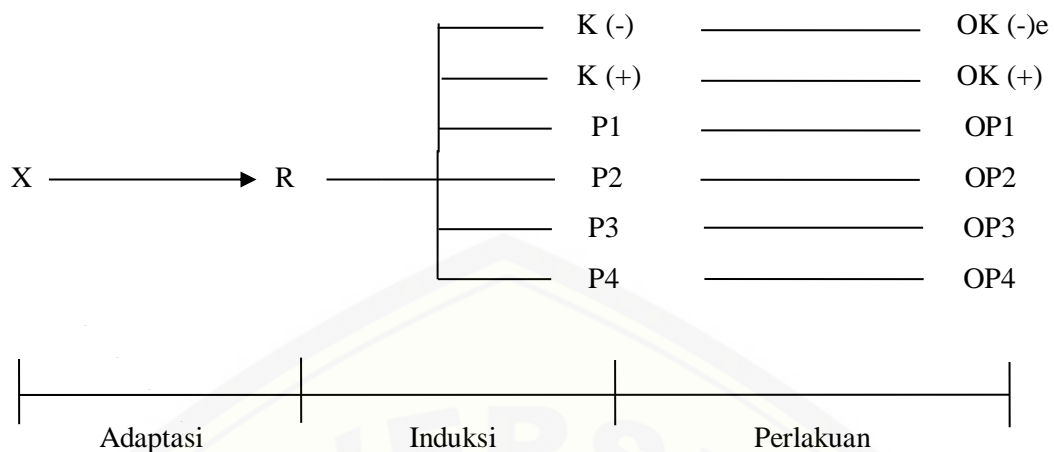
BAB III. METODE PENELITIAN

3.1 Jenis Penelitian

Penelitian ini merupakan jenis penelitian *true eksperimental* dengan adanya perlakuan, kontrol terhadap variabel, dan pengulangan, dengan rancangan *pretest-posttest control group design* yang menggunakan binatang percobaan sebagai objek penelitian.

3.2 Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian yang digunakan adalah *pretest-posttest control group design* yang menggunakan binatang percobaan sebagai objek penelitian. Dalam desain ini, Sugiyono menyatakan “bahwa terdapat dua kelompok yang masing-masing dipilih secara *random*. Kelompok pertama diberi perlakuan (X) dan kelompok lain tidak. Kelompok yang diberi perlakuan disebut kelompok eksperimen dan kelompok yang tidak diberi perlakuan disebut kelompok kontrol. Kemudian diberi pretest untuk mengetahui keadaan awal adakah perbedaan antara kelompok eksperimen dan kelompok kontrol” (Sugiyono, 2012). Perlakuan adalah dengan pemberian tetes mata berbagai tingkat konsentrasi ekstrak murbei pada tikus strain Wistar galur murni. Sedangkan keluarannya berupa jumlah koloni bakteri *S. aureus* pada jaringan konjungtiva yang mengalami konjungtivitis bakteri. Hewan percobaan akan dibagi menjadi 6 kelompok. Secara sistematis, rancangan penelitian dapat dilihat pada Gambar 3.1.



Keterangan:

X → R = Masa aklimatisasi (adaptasi) selama 1 minggu

R = Randomisasi

K (-) = Kontrol negatif, sebagai pembanding, tikus mendapatkan perlakuan tetes mata air mata artifisial (Cendo Lyteers 15 ml) +

S. aureus $1,5 \times 10^8$ CFU/ml

→ Kelompok Kontrol Negatif (K (-))

K (+) = Kontrol positif, sebagai pembanding, tikus mendapatkan perlakuan tetes mata antibiotik (Levofloxacin 0,5%) +

S. aureus $1,5 \times 10^8$ CFU/ml

→ Kelompok Kontrol Positif (K (+))

P1 = Tikus mendapatkan perlakuan tetes mata ekstrak daun Murbei 45% +

S. aureus $1,5 \times 10^8$ CFU/ml

→ Kelompok Murbei Dosis 1

P2 = Tikus mendapatkan perlakuan tetes mata ekstrak daun Murbei 55% +

S. aureus $1,5 \times 10^8$ CFU/ml

→ Kelompok Murbei Dosis 2

P3 = Tikus mendapatkan perlakuan tetes mata ekstrak daun Murbei 65% +

S. aureus $1,5 \times 10^8$ CFU/ml

→ Kelompok Murbei Dosis 3

P4 = Tikus mendapatkan perlakuan tetes mata ekstrak daun Murbei 75% +

S. aureus $1,5 \times 10^8$ CFU/ml

→ Kelompok Murbei Dosis 4

OK (-) = Pengamatan kelompok kontrol K (-)

OK (+) = Pengamatan kelompok kontrol K (+)

OP1 = Pengamatan kelompok perlakuan P1

OP2 = Pengamatan kelompok perlakuan P2

OP3 = Pengamatan kelompok perlakuan P3

OP4 = Pengamatan kelompok perlakuan P4

Gambar 3.1 Rancangan Penelitian

3.3 Tempat dan Waktu penelitian

- a. Proses ekstraksi daun murbei dilakukan di Laboratorium Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Jember, Laboratorium Biologi Fakultas Farmasi Universitas Jember.
- b. Pemeliharaan tikus wistar, pengujian ekstrak daun murbei (*Morus alba* L.) ke tikus strain Wistar galur murni dilakukan di Laboratorium Kandang Hewan Coba Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga Surabaya.
- c. Pembuatan tetes mata ekstrak, rekultur bakteri *S. aureus* dan menghitung jumlah bakteri *Staphylococcus aureus* dari *swab* sekret konjungtiva tikus wistar dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Negeri Surabaya.
- d. Waktu yang dibutuhkan untuk penelitian ini adalah 6 bulan dengan rincian 3 bulan untuk persiapan, studi pendahuluan dan pembuatan ekstrak daun murbei pada bulan September 2017 – November 2017 dan 3 bulan untuk penelitian dan analisis data pada bulan Desember 2017 – Februari 2018.

3.4 Populasi dan Sampel Penelitian

3.4.1 Populasi

Populasi penelitian adalah tikus strain Wistar galur murni.

3.4.2 Sampel

Sampel penelitian adalah 24 tikus strain Wistar galur murni yang diambil dengan teknik random sederhana (*simple random sampling*) dari populasi tikus yang kemudian akan dibagi menjadi 6 kelompok.

3.4.3 Cara Pengambilan Sampel

Kriteria inklusi meliputi:

- a. Tikus jantan
- b. Umur 2 – 3 bulan
- c. Berat badan 200 – 300 gram

- d. Tikus tampak aktif
- e. Pada pemeriksaan luar tidak tampak adanya kelainan anatomik, khususnya kelainan bola mata

Sedangkan kriteria eksklusi dalam pengambilan populasi adalah tikus mati sebelum dilakukan *swab* konjungtiva (Kurniawan, 2009).

3.4.4 Besar Sampel

Penelitian ini terdiri atas 6 perlakuan dan pengulangan 4 kali sesuai dengan Rumus Federer (Sugandi, 1993) yaitu.

$$(t-1)(r-1) > 15$$

Keterangan: t = jumlah perlakuan = 6

r = jumlah pengulangan per kelompok perlakuan

maka: $(t-1)(r-1) \geq 15$

$$(6-1)(r-1) \geq 15$$

$$5r-5 \geq 15$$

$$r \geq 4$$

Bedasarkan rumus Federer, jumlah minimum pengulangan tikus yang digunakan dalam setiap kelompok adalah 4 ekor. Untuk meningkatkan efektifitas pengujian statistik, pada penelitian ini menggunakan 24 ekor hewan.

3.5 Variabel Penelitian

3.5.1 Variabel Bebas

Variabel bebas pada penelitian ini adalah konsentrasi ekstrak daun murbei 45%, 55%, 65% dan 75%.

3.5.2 Variabel Terikat

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah jumlah koloni bakteri *S. aureus* dan perbaikan gejala konjungtivitis.

3.5.3 Variabel Terkendali

Variabel terkontrol dalam penelitian ini adalah

- a. media pertumbuhan bakteri
- b. waktu inkubasi
- c. tempat inkubasi
- d. suhu inkubator
- e. jenis tikus putih
- f. jenis bakteri *S. aureus*

3.6 Definisi Operasional

3.6.1 Konsentrasi Ekstrak Daun Murbei

Konsentrasi ekstrak murbei yaitu besaran volume ekstrak murbei yang mampu menghambat pertumbuhan bakteri *S. aureus* sebagai penyebab konjungtivitis. Cara ukur konsentrasi ekstrak murbei dari maserasi etanol 70% yang digunakan adalah 45%, 55%, 65%, dan 75% (gr) dalam pelarut akuades (ml). Ekstak murbei diperoleh dari bagian daun murni jenis *Morus alba* L. yang diperoleh secara komersial. Dosis pemakaian ekstrak murbei adalah 2 tetes (0,15 ml) pada kedua mata dan dilakukan setiap hari (Manek, 2017) selama 1 minggu dengan perbaikan gejala konjungtivitis (sampai sembuh dengan gejala konjungtivitis bakteri sudah kembali normal). Ekstrak daun murbei dimasukkan dalam botol tetes mata air mata artifisial Cendo Lyteers 15 ml dengan 1 tetesnya sama dengan 0,075 ml. Alat ukurnya menggunakan timbangan digital. Skalanya adalah rasio. Daun murbei (*Morus alba* L.) sebanyak 1,5 kg yang digunakan diperoleh dari Fakultas Pertanian Universitas Jember.

3.6.2 Jumlah koloni bakteri *Staphylococcus aureus*

Jumlah koloni bakteri *S. aureus* adalah jumlah bakteri *S. aureus* yang dihitung dari hasil *swab* konjungtiva dengan *cotton buds* pada sekret konjungtiva mata tikus putih strain Wistar galur murni yang terkena konjungtivitis setelah diinfeksi dengan *S. aureus*. Penghitungan jumlah bakteri menggunakan metode *Total Plate Count* (TPC) secara *pour plate* menggunakan *colony counter*, dilakukan setelah mata tikus

menunjukkan gejala konjungtivitis yaitu mata merah, radang, sekret purulen berwarna putih, hijau atau kuning lendir pada konjungtiva dan edema kelopak mata (Yeung, 2017). Penghitungan jumlah bakteri di lakukan setiap 48 jam selama 1 minggu (sampai sembuh dengan gejala konjungtivitis bakteri sudah kembali normal), karena dengan menggunakan antibiotik levofloxacin sembuh dalam jangka waktu 1 sampai 3 hari. Skalanya adalah rasio. Bakteri *S. aureus* $1,5 \times 10^8$ CFU/ml yang digunakan diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga.

3.6.3 Kontrol

a. Tetes mata kontrol negatif memiliki kandungan Sodium Chloride, Kalium Chloride, bentuknya tetes mata, satuan penjualannya botol, dengan kategori obat dan golongan obat bebas. Kemasannya adalah Tetes mata 0,01 % x 15 ml, dengan dosis pemakaian 3-4 kali sehari 1 atau 2 tetes. Indikasi penggunaan tetes mata ini adalah sebagai pengganti air mata pada kekurangan air mata, lubrikan/pelicin untuk air mata buatan, dan emolien/pelembut & pengganti air mata untuk pemakai lensa kontak (Medicastore, 2016). Skalanya adalah rasio. Tetes mata yang digunakan dalam penelitian ini adalah Cendo Lyteers botol, dan diproduksi oleh Cendo *Pharmaceutical Industries PT*, dengan dosis pemakaian 2 tetes (0,15 ml) pada kedua mata dan dilakukan setiap hari (Manek, 2017).

b. Tetes mata kontrol positif menggunakan antibiotic levofloxacin 0,5%. Indikasinya adalah untuk pengobatan topikal infeksi mata eksternal seperti konjungtivitis karena mikroorganisme. Dosisnya 3 kali sehari, 1 tetes. Kontraindikasinya adalah hipersensitivitas terhadap kuinolon, dengan reaksi efek samping obat berupa iritasi mata dan kelopak mata gatal. Skalanya adalah rasio. Tetes mata yang digunakan dalam penelitian ini adalah Cravit Levofloxacin 0,5% tetes mata 5 ml, dan diproduksi oleh *PT Ferron Par Pharmaceuticals* (Ferron, 2017), dengan dosis pemakaian 2 tetes (0,15 ml) pada kedua mata dan dilakukan setiap hari (Manek, 2017).

3.6.4 Perbaikan Gejala Konjungtivitis

Gejala konjungtivitis yaitu mata merah, radang, sekret purulen berwarna putih, hijau atau kuning lendir pada konjungtiva dan edema kelopak mata (Yeung, 2017). Perbaikan gejala konjungtivitis bakteri yaitu hilangnya mata merah, radang, sekret purulen berwarna putih, hijau atau kuning lendir pada konjungtiva dan hilangnya edema kelopak mata selama perlakuan, dan di amati setiap 24 jam selama 1 minggu untuk melihat adanya pengaruh dari ekstrak murbei (sampai sembuh dengan gejala konjungtivitis bakteri sudah kembali normal), karena dengan menggunakan antibiotik levofloxacin sembuh dalam jangka waktu 1 sampai 3 hari. Konjungtivitis bakteri akut umumnya adalah *self-limiting* dan sembuh dalam 10-14 hari. Jika diobati, kondisinya akan sembuh dalam 1-3 hari (Miller, 2011 dalam Mahon *et al.*, 2011). Konjungtivitis bakteri akut didefinisikan sebagai konjungtivitis yang berlangsung kurang dari 3 minggu, (Dart, J., K., G., 1986; McDonnell, P., J., 1988). Sedangkan konjungtivitis bakteri kronis tanda dan gejala timbul lebih dari 3 minggu dan sering terjadi kekambuhan (Rubenstein, 1999). Masa inkubasi konjungtivitis bakteri adalah 24-72 jam (Bighollow, 2017). Masa inkubasi dan periode infeksi tergantung penyebab dari konjungtivitis dapat berkisar 1-12 hari, tergantung organisme dan pengobatan yang diberikan (Hydepark, 2010). Cara ukurnya adalah deskriptif. Alat ukurnya adalah kamera digital dan kaca pembesar. Skala perbaikan gejala konjungtivitis adalah ordinal.

3.7 Alat dan Bahan Penelitian

a. Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain tabung reaksi, Erlenmeyer 500 ml dan 1 liter, corong kaca, pipet tetes, spuid volume 1 ml dan 5 ml, timbangan digital, *micropipette* 1000 μ l, *blue tip*, *yellow tip*, rak tabung reaksi, pembakar spirtus, cawan petri, *aluminium foil*, *plastic wrap*, *autoklaf*, kapas, gelas ukur, *cool box*, label, tali kasur, plastik pp, ose, LAF, *Rotary evaporator*, *cotton bud*, gelas beker 500 ml, panci, kompor, oven, dan pengaduk, kandang tikus.

1.5 Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah bakteri *S. aureus*, Tikus putih akuades, alkohol 70%, MSA agar (*Mannitol Salt Agar* yang terdiri atas Lab-Lemco' powder 1.0 Peptone 10.0 Mannitol 10.0 g/l, Sodium chloride 75.0 g/l, Phenol red 0.025 Agar 15.0 g/l, pH $7.5 \pm 0.2 @ 25^{\circ}\text{C}$), *Nutrient agar dan nutrient Broth*, etanol, HCL pekat, kloroform, levofloxacin 0,5%, Cendo Lyteers 15 ml, tikus putih strain Wistar galur murni, pakan tikus dan akuades.

3.8 Prosedur Penelitian

3.8.1 Uji Kelayakan Etik

Subjek yang digunakan dalam penelitian ini adalah tikus yang dalam pelaksanaannya harus mendapat sertifikat kelayakan etik, sehingga perlu diajukan ke komisi etik kedokteran, prosedur ini diharapkan akan menjamin keamanan bagi peneliti maupun hewan coba, melindungi hewan coba, serta memperjelas tujuan dan kewajiban peneliti. Peneliti mengirim berkas permohonan *ethical clearance* ke komisi etik Fakultas Kedokteran Universitas Jember. Penelitian ini sudah dilakukan sesuai dengan etik nomor: 1148/H25.1.11/KE/2018.

3.8.2 Persiapan (Sterilisasi Alat) dan Perizinan

Semua peralatan yang akan digunakan baik peralatan gelas ataupun peralatan *non glass* disterilisasi. Peralatan gelas seperti cawan petri, erlenmeyer, *beaker glass*, gelas ukur, tabung reaksi, dilakukan sterilisasi kering menggunakan oven. Semua peralatan tersebut sebelum disterilisasi dibungkus menggunakan kertas berwarna putih dan diikat menggunakan tali kasur. Sterilisasi menggunakan oven dilakukan selama 2 jam dengan suhu 160°C . Peralatan *non glass* seperti *microtip* disterilisasi menggunakan *autoklaf* dengan suhu 121°C , tekanan 1 atm selama 15 menit. Peneliti memohon dibuatkan surat pengantar izin penelitian dari Fakultas Kedokteran Universitas Jember kepada Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga. Keterangan persetujuan izin penelitian oleh Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga pada peneliti terdapat pada Lampiran 3.2.

3.8.3 Pembuatan Media *Nutrient Agar* (NA)

Media *Nutrient Agar* (NA) (Merck) sebanyak 8 g/l dilarutkan dalam 1000 ml akuades ditambah 15 g agar. Media NA dilarutkan dengan cara dipanaskan di atas api kompor sampai media mendidih dan larut sempurna. Media NA dibagi dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan erlenmeyer. Tabung reaksi dan Erlenmeyer yang berisi media NA ditutup menggunakan kapas dan *aluminium foil* dan dibungkus menggunakan kertas bekas. Media NA disterilisasi menggunakan *autoklaf* pada temperatur 121°C, tekanan 1 atm, waktu 15 menit. Tabung reaksi yang berisi media NA dimiringkan pada bidang datar dengan kemiringan $\pm 45^\circ$ untuk membuat media NA miring. Media NA disimpan di dalam kulkas dengan suhu 4°C.

3.8.4 Pembuatan Media *Nutrient Broth*

Media *Nutrient Broth* (NB) (Merck) sebanyak 8 g/l dilarutkan dalam 1000 ml akuades. Media NB dan akuades dihomogenkan dengan cara dipanaskan di atas api kompor. Media NB dibagi dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan erlenmeyer sesuai dengan kebutuhan. Tabung reaksi dan Erlenmeyer yang berisi media NB ditutup menggunakan kapas dan *aluminium foil* dan dibungkus menggunakan kertas bekas. Media NB disterilisasi menggunakan *autoklaf* pada suhu 121°C, tekanan 1 atm selama 15 menit. Media NB disimpan di dalam kulkas dengan suhu 4°C.

a. Pembuatan Media MSA (*Mannitol Salt Agar*)

Media MSA (*Mannitol Salt Agar*)(Merck) sebanyak 105 g/l dilarutkan dalam 1000 ml akuades. Media MSA dan akuades dihomogenkan dengan cara dipanaskan di atas api kompor. Media MSA dibagi dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan erlenmeyer sesuai dengan kebutuhan. Tabung reaksi dan Erlenmeyer yang berisi media MSA ditutup menggunakan kapas dan *aluminium foil* dan dibungkus menggunakan kertas bekas. Media MSA disterilisasi menggunakan *autoklaf* pada suhu 121°C, tekanan 1 atm selama 15 menit. Media MSA apabila belum digunakan dapat disimpan di dalam kulkas dengan suhu 4°C. Media ini mengandung kadar NaCl tinggi, sehingga akan menghambat pertumbuhan bakteri, namun *Staphylococcus* tidak di hambat pertumbuhannya. *S. aureus* akan membentuk zona

kuning. Sedangkan *Staphylococcus epidermis* akan membentuk zona merah. Warna kuning disebabkan oleh fermentasi mannitol disertai pembentukan asam, sedangkan warna merah disebabkan oleh mannitol yang tidak difermentasikan.

b. Media *Nutrient Broth* (NB) (Merck) sebanyak 60 g/l dilarutkan dalam 1000 ml akuades. Media NB dan akuades dihomogenkan dengan cara dipanaskan diatas api kompor. Media NB dibagi dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan erlenmeyer sesuai dengan kebutuhan. Tabung reaksi dan Erlenmeyer yang berisi media NB ditutup menggunakan kapas dan *aluminium foil* dan dibungkus menggunakan kertas bekas. Media NB disterilisasi menggunakan *autoklaf* pada suhu 121°C, tekanan 1 atm selama 15 menit. Media NB apabila belum digunakan dapat disimpan di dalam kulkas dengan suhu 4°C.

3.8.5 Rekultur *Staphylococcus aureus*

Kultur murni *S. aureus* diperoleh dari laboratorium Mikrobiologi Universitas Airlangga Surabaya pada medium miring *nutrient agar*, sehingga dalam perbanyakannya juga digunakan medium *nutrient agar*. Isolat murni *S. aureus* diperbanyak pada media agar di cawan petri dan tabung reaksi miring dengan menggunakan metode “streak”, diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 -48 jam.

Staphylococcus aureus dari medium agar diambil dengan menggunakan ose dan dimasukkan ke dalam medium *nutrient broth* secara aseptis. Selanjutnya medium *nutrient broth* yang telah diinokulasi dengan *S. aureus* diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Kultur *S. aureus* dalam medium cair *nutrient broth* dilakukan untuk persiapan infeksi pada mata tikus putih strain Wistar sehingga memunculkan gejala konjungtivitis.

3.8.6 Pembuatan Ekstrak Daun Murbei (Maserasi) dan Tetes Mata

Daun murbei yang didapatkan dari Fakultas Pertanian Universitas Jember sebanyak 1,5 kg dikeringkan. Setelah kering, daun murbei diblender menjadi serbuk simplisia. Serbuk simplisia sebanyak 348,62 gram diekstraksi dengan menggunakan metode maserasi ke dalam wadah kaca dengan cara dibasahi sedikit demi sedikit terlebih dahulu menggunakan penyari etanol 70%. Setelah terbasahi sempurna dicukupkan dengan sisa penyari etanol lalu wadah di tutup rapat. Metode maserasi dilakukan selama 3 hari dan dilakukan pengadukan setiap harinya. Cairan yang diperoleh di saring untuk mendapatkan hasil filtratnya, sedangkan ampas diremaserasi kembali menggunakan penyari etanol 70%. Filtrat yang diperoleh diuapkan dengan menggunakan rotary evaporator hingga didapatkan ekstrak pekat kemudian di uapkan hingga membentuk ekstrak etanol kental. Ekstrak etanol daun murbei diperoleh 27,77 gram. Konsentrasi ekstrak etanol daun murbei 45%, 55%, 65% dan 75% (gr) dilarutkan dalam akuades (ml) dan dibuat tetes mata.

Pada penelitian ini juga telah dilakukan pengujian sterilisasi ekstrak daun murbei yaitu dengan menambahkan ekstrak daun murbei pada medium *Nutrient Agar* (NA). Hal ini dilakukan untuk membuktikan bahwa ekstrak sudah benar-benar steril dan tidak adanya pengaruh luar yang mempengaruhi pertumbuhan bakteri seperti faktor kontaminasi bakteri. Dari uji sterilisasi menunjukkan bahwa ekstrak daun murbei yang dimasukkan dalam medium NA tidak memperlihatkan pertumbuhan bakteri apapun sehingga dapat dikatakan bahwa ekstrak daun murbei dan medium NA yang digunakan dalam penelitian ini bebas dari kontaminasi bakteri luar (steril).

3.8.7 Perlakuan Hewan Laboratorium

a. Hewan laboratorium yang digunakan adalah tikus putih jantan strain Wistar galur murni dengan jumlah 24 ekor tikus yang dibagi menjadi 6 kelompok secara randomisasi dengan kriteria tikus jantan, umur 2 – 3 bulan, berat badan 200 – 300 gram, tikus tampak aktif, dan pada pemeriksaan luar tidak tampak adanya kelainan anatomik, khususnya kelainan bola mata. Tikus-tikus itu diadaptasikan selama 1 minggu (hari 1-7) dalam kandang dan lingkungan yang sama. Tikus putih jantan

strain Wistar diperoleh dari Kandang Hewan Coba Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga. Surat keterangan sehat hewan laboratorium terdapat pada Lampiran 3.3.

b. Tikus dikelompokkan menjadi 6 kelompok yang berisi 4 tikus pada tiap kelompok. Pembagian kelompok tikus dapat dilihat pada Tabel 3.1.

Tabel 3.1 Pembagian kelompok tikus

Nama Kelompok	Perlakuan yang Diberikan
Kelompok K(-)	Tikus mendapatkan perlakuan tetes mata air mata artifisial (Cendo Lyteers 15 ml) sebanyak 2 tetes (0,15 ml) dan <i>S. aureus</i> $1,5 \times 10^8$ CFU/ml sebanyak 1 tetes tiap 10 menit selama 1 jam
Kelompok K(+)	Tikus mendapatkan perlakuan tetes mata antibiotik (Levofloxacin 0,5%) sebanyak 2 tetes (0,15 ml) dan <i>S. aureus</i> $1,5 \times 10^8$ CFU/ml sebanyak 1 tetes tiap 10 menit selama 1 jam
Kelompok P1	Tikus mendapatkan perlakuan tetes mata ekstrak daun Murbei 45% sebanyak 2 tetes (0,15 ml) dan <i>S. aureus</i> $1,5 \times 10^8$ CFU/ml sebanyak 1 tetes tiap 10 menit selama 1 jam
Kelompok P2	Tikus mendapatkan perlakuan tetes mata ekstrak daun Murbei 55% sebanyak 2 tetes (0,15 ml) dan <i>S. aureus</i> $1,5 \times 10^8$ CFU/ml sebanyak 1 tetes tiap 10 menit selama 1 jam
Kelompok P3	Tikus mendapatkan perlakuan tetes mata ekstrak daun Murbei 65% sebanyak 2 tetes (0,15 ml) dan <i>S. aureus</i> $1,5 \times 10^8$ CFU/ml sebanyak 1 tetes tiap 10 menit selama 1 jam
Kelompok P4	Tikus mendapatkan perlakuan tetes mata ekstrak daun Murbei 75% sebanyak 2 tetes (0,15 ml) dan <i>S. aureus</i> $1,5 \times 10^8$ CFU/ml sebanyak 1 tetes tiap 10 menit selama 1 jam

c. Pada hari ke-8, tikus mulai diinduksi konjungtivitis dengan diinfeksi *S. aureus* $1,5 \times 10^8$ CFU/ml sebanyak 1 tetes tiap 10 menit selama 1 jam pada kedua mata dengan tetes mata.

d. Tikus dibiarkan selama 3 hari (hari ke-9, 10 dan 11) untuk mengalami konjungtivitis dan dilakukan pengamatan gejala konjungtivitis.

e. Pemberian ekstrak daun murbei (*Morus alba* L.) yang dilarutkan pada akuades dengan konsentrasi 45%, 55%, 65% dan 75%, kontrol negatif dengan menggunakan Cendo Lyteers serta kontrol positif dengan levofloxacin 0,5%, baru diberikan pada hari ke-12 sampai hari ke-19 setelah mata tikus mengalami konjungtivitis dengan dosis pemakaian 2 tetes (0,15 ml) pada kedua mata dan dilakukan setiap hari (Manek, 2017) selama 1 minggu (sampai gejala konjungtivitis hilang) dengan tetes mata.

f. Untuk kualitas data penelitian, dilakukan kontrol terhadap perawatan hewan coba yaitu:

- 1) Tikus ditempatkan pada kandang khusus, di mana setiap kandang berisi maksimal 10 ekor tikus.
- 2) Kandang hewan coba dibersihkan secara teratur dengan kebersihan dan frekuensi yang sama.
- 3) Kandang hewan coba mendapat pencahayaan dan ventilasi yang memadai dan kualitasnya sama untuk setiap kandang
- 4) Pakan standar tikus berupa pelet dan air minum diberikan secara *ad libitum*.

g. Apabila dijumpai tikus dengan kelainan pada bola mata atau mati sebelum dilakukan *swab* konjungtiva, maka tikus dikeluarkan dari penelitian dan diganti tikus yang baru dengan perlakuan yang sama sesuai kelompok tikus yang digantikan.

h. Pemilihan, perawatan, perlakuan, pengorbanan dan pemusnahan hewan coba mengacu pada buku pedoman etik penelitian kesehatan (penggunaan hewan coba dengan prinsip 3R: *Reduced, Reuse, Redefined*). Prinsip etik penggunaan hewan coba yaitu *reduction* (penggunaan hewan coba dalam jumlah sekecil mungkin, tetapi memberikan hasil optimal), *refinement* (mengurangi rasa distress dengan memakai obat analgesik, sedativa, analgesik atau melakukan prosedur secara benar oleh tenaga ahli/tehnisi yang terlatih) dan *replacement*. Tiga pilar prinsip etik penelitian yaitu *respect for animals*, *beneficence* dan *justice* (Ardana, 2015).

i. Untuk pembuangan limbah mikrobiologi berupa tikus dengan konjungtiva terinfeksi *S. aureus*, setelah penelitian selesai, tikus diterminasi menggunakan kloroform dalam wadah kaca tertutup, lalu dikremasi dengan insenerator menggunakan bahan bakar solar. Prosedur ini dilakukan di Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga.

3.8.8 Pengambilan Sampel

Sampel berupa jumlah bakteri *S. aureus* yang terdapat pada sekret mata tikus yang terkena konjungtivitis bakteri dilakukan dengan metode *Swab* (Asri *et al.*, 2016) dengan cara sekret yang terdapat pada selaput konjungtiva dari mata berwarna merah karena konjungtivitis di *swab* dengan menggunakan *cotton bud* steril. Selanjutnya bakteri yang tertangkap pada *cotton bud* di larutkan pada akuades steril dan dihitung dengan menggunakan metode *pour plate* untuk mendapatkan *total plate count* nya.

3.8.9 Menghitung Jumlah Bakteri Metode *Pour plate* dari *Swab* Sekret Konjungtiva Tikus

Menurut Asri *et al.* (2016) prosedur untuk menghitung bakteri dengan metode *pour plate* dari *swab* sekret konjungtiva mata adalah

- a. Sampel uji berupa sekret dari *swab* (dengan *cotton bud* steril) pada konjungtiva mata tikus putih yang mengalami konjungtivitis.
- b. Sekret dari *swab* dilarutkan pada akuades sebanyak 1 mL kemudian dilakukan pengenceran secara “*dilution*” yaitu dimasukkan ke dalam tabung reaksi berisi 9 mL akuades steril. Suspensi tersebut merupakan pengenceran 10^{-1} . Setiap langkah tersebut dilakukan secara aseptis.
- c. Suspensi dari pengenceran 10^{-1} diambil 1 mL (sebelum pengambilan terlebih dahulu dilakukan homogenasi) dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi berisi 9 mL akuades steril. Suspensi tersebut merupakan pengenceran 10^{-2} . Langkah tersebut diulangi sampai mendapatkan suspensi dengan faktor pengenceran 10^{-5} sampai 10^{-7} . Banyaknya pengenceran tergantung pada tingkat kepekatan mikroba sample.
- d. Secara aseptis, di ambil 0,1 mL dari pengenceran 10^{-5} , 10^{-6} , dan 10^{-7} , kemudian dimasukkan ke dalam cawan petri steril secara terpisah.
- e. Media MSA (Mannitol Salt Agar) dituang yang telah dicairkan terlebih dahulu dan suhu media kurang lebih 45°C ke setiap cawan petri yang telah berisi sampel.
- f. Campuran sampel dan media dihomogenkan dengan cara diputar beberapa kali.
- g. Biakan tersebut di inkubasi dengan posisi cawan petri terbalik, pada suhu

antara 37°C selama 24-48 jam.

h. Jumlah koloni yang muncul (koloni dikelilingi oleh zona bening berwarna kekuningan) dihitung dengan menggunakan *colony counter* untuk mendapatkan *Total Plate Count (TPC)* *S. aureus*. Jumlah koloni bakteri yang dapat digunakan untuk TPC adalah 30 -300.

i. Penghitungan jumlah koloni bakteri *S. aureus* ke-1, dan ke-2, dilakukan pada waktu H+3 setelah tikus diinfeksi *S. aureus* (hari ke- 11), dan H+5 setelah pemberian ekstrak daun murbei (hari ke-17).

3.8.10 Pengamatan Perbaikan Gejala Konjungtivitis Tikus dan Waktu Kesembuhan Tikus yang Terkena Konjungtivitis Bakteri

Pengamatan perbaikan gejala konjungtivitis tikus yang terkena konjungtivitis bakteri dilakukan secara deskriptif (dengan menggunakan skala) dan didokumentasikan dengan menggunakan kamera digital. Pengamatan gejala konjungtivitis tikus dilakukan selama 3 hari (hari ke-9, 10 dan 11) setelah tikus diinfeksi dengan *S. aureus* $1,5 \times 10^8$ CFU/ml sebanyak 1 tetes tiap 10 menit selama 1 jam pada kedua mata meliputi kelopak mata terdapat hiperemi (merah), konjungtiva terdapat hiperemi (merah) dari pinggir bola menuju ke sentral bola mata, adanya sekret dan apparatus lakrimal tampak keruh terdapat pembengkakan berwarna merah di bawah kelopak mata (Ilyas, 2014). Gejala konjungtivitis yaitu mata merah, radang, sekret purulen berwarna putih, hijau atau kuning lendir pada konjungtiva dan edema kelopak mata (Yeung, 2017). Pengamatan gejala konjungtivitis ini dihentikan setelah konjungtiva kembali normal (± 7 hari). Pengamatan gejala konjungtivitis pada tikus, meliputi kelopak mata, konjungtiva, sekret, apparatus lakrimal dapat dilihat pada Tabel 3.2.

Tabel 3.2 Pengamatan gejala konjungtivitis tikus

No	Tanda Klinis	Pengamatan	Perbandingan Hasil 'U1, U2, U3, U4
1.	Kelopak mata	Bengkak	++
2.	Konjungtiva	Lebih merah	++
3.	Sekret	Ada	++
4.	Aparatus lakrimal	Keruh	++

++, +++, +++++ = konjungtivitis; + = mata normal
 U1, U2, U3, U4 = Rata-rata tikus ulangan 1, 2, 3, 4
 ' = Tikus K(-), K(+), P1, P2, P3, P4

Konjungtiva:

+ = tidak merah;
 ++ = sedikit merah;
 +++ = merah;
 +++++ = sangat merah;

Sekret:

+ = tidak ada;
 ++ = sedikit;
 +++ = banyak;
 +++++ = sangat banyak;

Kelopak mata:

+ = tidak bengkak;
 ++ = sedikit bengkak;
 +++ = bengkak;
 +++++ = sangat bengkak;

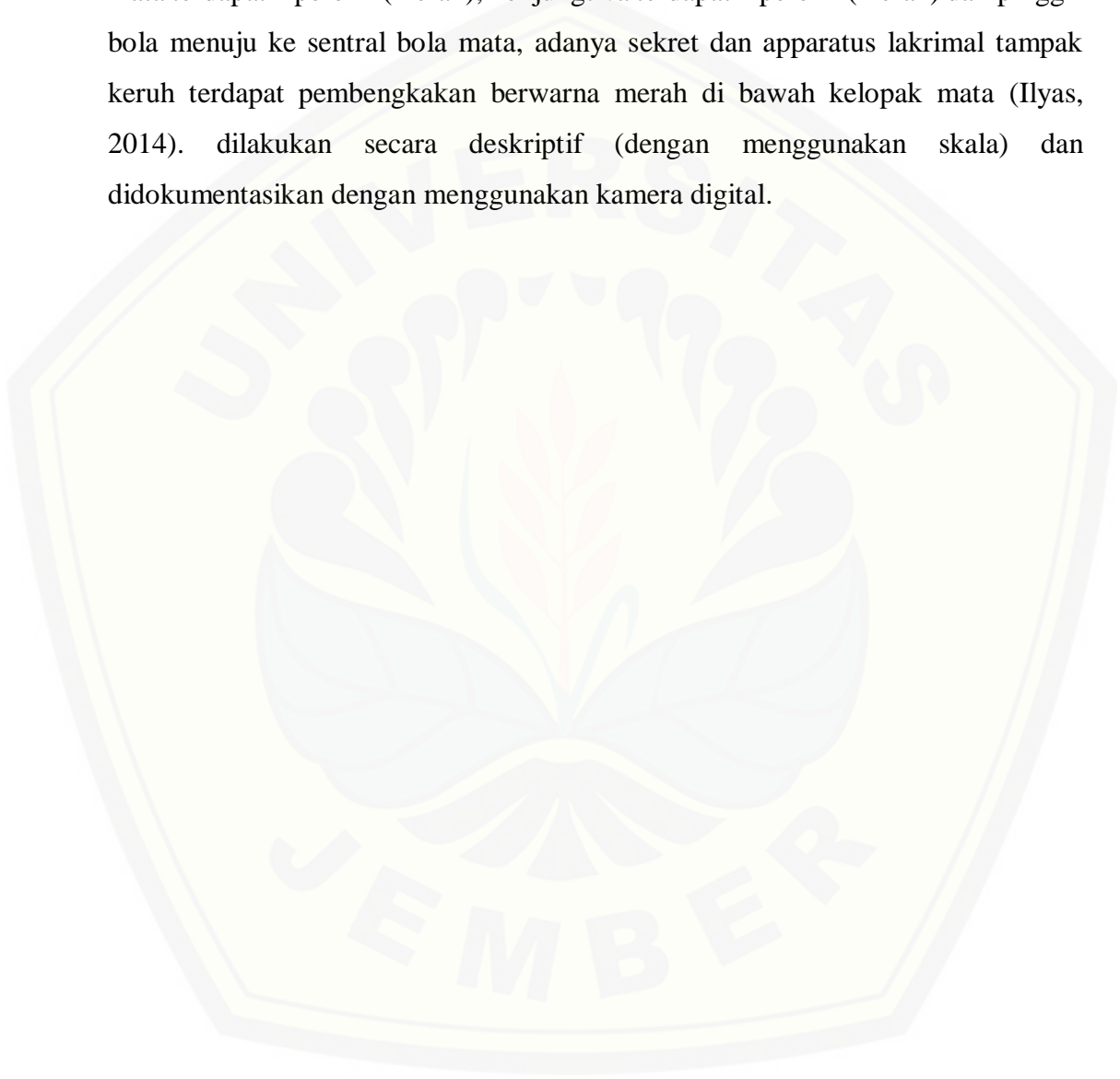
Aparatus lakrimal:

+ = merah;
 ++ = sedikit keruh;
 +++ = sangat keruh;
 +++++ = hitam;

3.9 Metode Pengumpulan Data

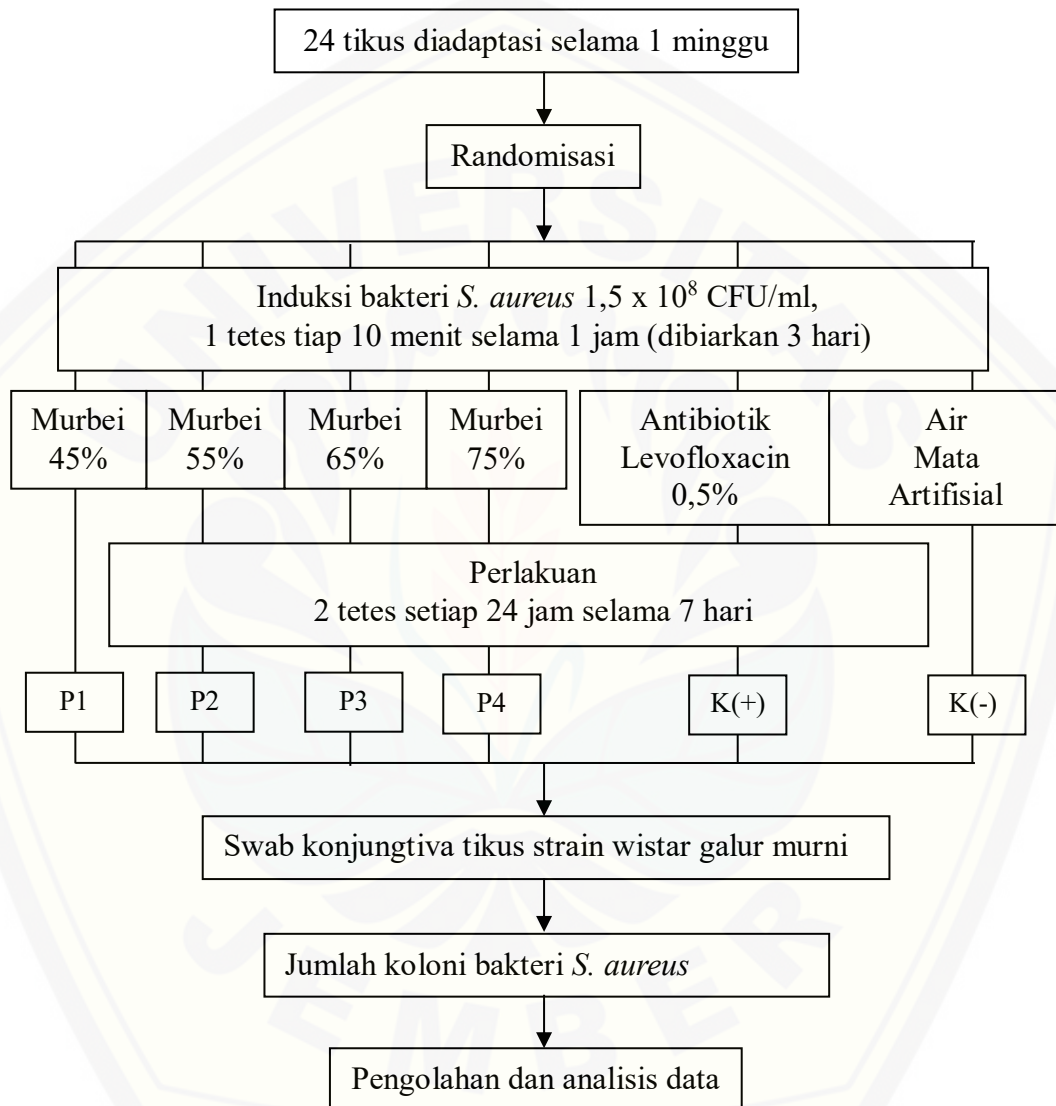
Pengumpulan data pada penelitian ini diambil dari hasil penghitungan jumlah koloni bakteri *S. aureus* setiap 48 jam sebelum dan setelah pemberian ekstrak daun murbei dari *swab* konjungtiva tikus strain Wistar galur murni dengan metode *Total Plate Count* (TPC) secara *pour plate* menggunakan *colony counter* pada agar cawan yang berjumlah 30 sampai 300 koloni *S. aureus*. Penghitungan jumlah koloni bakteri *S. aureus* pada kelompok *pretest* dan *posttest*, dilakukan pada waktu H+3 setelah tikus diinfeksi *S. aureus* (hari ke- 11), dan H+5 setelah pemberian ekstrak daun murbei (hari ke-17). Data kuantitatif yang diperoleh berupa jumlah koloni bakteri *S. aureus* (*Total Plate Count*/TPC) pada media MSA dari *swab* konjungtiva tikus wistar pada hari ke-11 dan hari ke-17 dari adaptasi tikus. Sedangkan data kualitatif

yaitu pengamatan perbaikan gejala konjungtivitis bakteri dilakukan setiap 24 jam sebelum dan setelah pemberian ekstrak daun murbei pada tikus wistar yaitu hilangnya mata merah, radang, sekret purulen berwarna putih, hijau atau kuning lendir pada konjungtiva dan hilangnya edema kelopak mata (Yeung, 2017), kelopak mata terdapat hiperemi (merah), konjungtiva terdapat hiperemi (merah) dari pinggir bola menuju ke sentral bola mata, adanya sekret dan apparatus lakrimal tampak keruh terdapat pembengkakan berwarna merah di bawah kelopak mata (Ilyas, 2014). dilakukan secara deskriptif (dengan menggunakan skala) dan didokumentasikan dengan menggunakan kamera digital.



3.10 Alur Penelitian

Penelitian ini dilakukan sesuai dengan tahapan penelitian yang terdiri atas persiapan, perlakuan, pengambilan data, analisis data, pembahasan dan penarikan kesimpulan.



Gambar 3.2 Alur penelitian

3.11 Analisis Data

Data yang diperoleh berupa jumlah koloni bakteri *S. aureus*. Data kuantitatif (jumlah bakteri) dianalisis dengan menggunakan statistik parametrik apabila berdistribusi normal. Sehingga data diuji normalitasnya terlebih dahulu. Data dianalisis dengan melihat dari distribusi data, diuji dengan uji normalitas *Shapiro-Wilk* ($p > 0,05$), karena jumlah sampel < 50 dan uji *Lavene* ($p > 0,05$) untuk mengetahui homogenitas. Apabila data yang didapatkan terdistribusi normal dan homogen, maka dilanjutkan dengan uji *Anova One Way* ($p < 0,05$). Uji dengan Analisis Varian Satu Arah dilakukan untuk mengetahui pengaruh dari perlakuan yang diberikan. Apabila data yang didapatkan terdistribusi tidak normal dan tidak homogen, maka dilanjutkan dengan uji *Kruskal-Wallis* ($p > 0,05$). Jika hasil dari Analisis Varian Satu Arah didapatkan hasil signifikan ($p < 0,05$), dilanjutkan dengan uji *Post-Hoc LSD* ($p < 0,05$) untuk membandingkan hasil (beda nyata) dari setiap perlakuan. Uji *paired t-test* ($p < 0,05$) dilakukan karena membandingkan beda nyata dari 2 kelompok *pretest* dan kelompok *posttest*. Uji statistik terhadap data yang diperoleh dilakukan dengan menggunakan program SPSS 16.0 *for Windows*. Untuk data kualitatif yaitu perbaikan gejala konjungtivitis dianalisis secara deskriptif kuantitatif.

BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Kesimpulan dari penelitian ini adalah:

- a. Ekstrak etanol daun Murbei (*Morus alba* L.) memiliki efek dapat menurunkan jumlah koloni bakteri *S. aureus* pada tikus wistar model konjungtivitis oleh *S. aureus*.
- b. Ekstrak etanol daun Murbei (*Morus alba* L.) memiliki efek dapat memperbaiki gejala klinis konjungtivitis pada tikus wistar model konjungtivitis oleh *S. aureus*.

5.2 Saran

Berdasarkan hasil penelitian yang diperoleh, maka saran untuk penelitian ini adalah sebagai berikut.

- a. Perlu dilakukan isolasi senyawa-senyawa kimia dalam ekstrak daun murbei dan uji toksisitas atau efek samping penggunaan tetes mata ekstrak daun murbei sebelum dilakukan penelitian ke manusia.
- b. Untuk penelitian selanjutnya, dengan dosis yang lebih bervariasi diharapkan dapat menentukan dosis efektif, dosis letal, dosis minimum, dosis maksimum untuk tetes mata menggunakan ekstrak daun murbei pada tikus konjungtivitis karena *S. aureus*.
- c. Untuk penelitian dengan ekstrak daun murbei selanjutnya, diharapkan dapat menggunakan bakteri lain sebagai penyebab konjungtivitis, pengamatan indikator adanya inflamasi oleh bakteri seperti jumlah leukosit jenis neutrophil dan limfosit.
- d. Untuk penelitian selanjutnya, diharapkan dapat dilakukan pada hewan coba lainnya, seperti kelinci, yang memiliki ukuran konjungtiva yang lebih luas dibandingkan tikus.

DAFTAR PUSTAKA

- Afjeiee, S.A., S.R. Tabatabaei, F. Fallah, F. Shiva, N.T. Zanjani, dan A.T. Fard. 2013. A microbiological study of neonatal conjunctivitis in two hospitals in Teheran Iran. *Asian Pasific Journal of Tropical Disease*. 3(6): 429-433
- Anonim. 2017. *Staphylococcus aureus*.
<http://digilib.unila.ac.id/9739/11/12.%20Bab%20II.pdf> [Diakses pada 17 September 2017]
- Ardana, I.B. 2015. Etika Menggunakan Hewan Coba dalam Penelitian Kesehatan.
<http://erepo.unud.ac.id/1946/1/073677cdb9329dd673a231dd59a51417.pdf>
[Diakses pada 26 Januari 2018]
- Asri, M.T., G. Trimulyono, dan L. Lisdiana. 2016. *Petunjuk Praktikum Mikrobiologi Dasar*. Surabaya: Jurusan Biologi FMIPA Universitas Negeri Surabaya
- Baron, S. 1996. *Medical Microbiology*. Texas: University of Texas Medical Branch at Galveston. 4 th edition
- Bighollow, 2017. Notification of Conjunctivitis (Pink-Eye can be Bacterial or Viral Infection).
<http://www.bighollow.us/uploads/5/6/8/6/56865445/notification-conjunctivitis.pdf> [Diakses pada 2 Oktober 2017]
- BPOM RI. 2010. *Acuan Sediaan Herbal*. Jakarta: Direktorat OAI, Deputi II, Badan POM RI
- CDC. 2011. *Staphylococcus aureus* in Healthcare Settings.
<https://www.cdc.gov/hai/organisms/staph.html> [Diakses pada 17 September 2017]
- CDC. 2016. Conjunctivitis (Pink Eye).
<https://www.cdc.gov/conjunctivitis/clinical.html> [Diakses pada 17 September 2017]
- Chen, P.N. 2006. Mulberry anthocyanins, cyanidin 3-rutinoside and cyanidin 3-glucoside, exhibited an inhibitory effect on the migration and invasion of a human lung cancer cell line. *Cancer Letter*. 235(2): 248-259
- Chung, S.H., K.H. Nam, dan M.N. Kweon. 2009. *Staphylococcus aureus* accelerates an experimental allergic conjunctivitis by toll-like receptor 2-dependent manner. *Clin. Immunol*. 131: 170–177.

- Crounau, H., R.R. Kankanala, dan T. Mauger. 2010. Diagnosis and management of red eye in primary care. *Am Fam Physician*. 81: 137-44.
- Dahl, A.A. 2009. Eye Diseases and Conditions.
http://www.medicinenet.com/imagecollection/bacterial_conjunctivitis_pink_eye_picture/picture.htm [Diakses pada 11 Juni 2017]
- Darsana, I.G., I.N. Besung, dan H. Mahatmi. 2012. Potensi Daun Binahong (Anredera Cordifolia (Tenore) Steenis) dalam Menghambat Pertumbuhan Bakteri Escherichia coli secara In Vitro. *Indonesia Medicus Veterinus*. 1(3): 337-351
- Dhadhang. 2013. Sediaan Obat Mata.
<https://dhadhang.files.wordpress.com/2013/10/sediaan-mata.pdf> [Diakses pada 11 Juni 2017]
- Dwidjoseputro. 2005. *Dasar-Dasar Mikrobiologi*. Djakarta: Penerbit Djambatan
- Epling J., dan J. Smucny. 2010. Bacterial conjunctivitis. *Clin Evid*. 2(14): 756-761
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2907624/> [Diakses pada 12 Februari 2018]
- Feldman, H.B., dan K.D. Epley. 2014. *Bacterial Conjunctivitis*.
http://eyewiki.aao.org/Bacterial_Conjunctivitis [Diakses pada 15 Juni 2017]
- Ferron, 2017. Cravit.
<http://www.ferron-pharma.com/id/produk/ophthalmological/cravit> [Diakses pada 3 September 2017]
- Fujishima, H., N. Okada, M. Dogru, F. Baba, M. Tomita, J. Abe, K. Matsumoto, dan H. Saito. 2012. The role of Staphylococcal enterotoxin in atopic keratoconjunctivitis and corneal ulceration. *Allergy*. 67: 799–803
- George M., dan Bohigian. *Handbook of External Disease of The Eye*. New Jersey: Slack Incorporated. Third Edition. 1987.p.19
- Haq, A., H. Wardak, dan N. Kraskian. 2013. Infective Conjunctivitis – Its Pathogenesis, Management and Complications.
<https://www.intechopen.com/books/common-eye-infections/infective-conjunctivitis-its-pathogenesis-management-and-complications> [Diakses pada 11 Juni 2017]
- Hasyim, A.A. 2010. Struktur Lainnya – Conjunctiva.
<http://duniamata.blogspot.co.id/2010/05/struktur-lainnya-conjunctiva.html> [Diakses pada 11 Juni 2017]

- Hastuti, U.S., A. Oktantia, dan H.N. Khasanah. 2012. Daya Antibakteri Daun dan Buah Murbei (*Morus alba L.*) terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Shigella dysenteriae*. *Seminar Nasional IX Pendidikan Biologi FKIP UNS* 9(1). *Program Studi Pendidikan Biologi FKIP Universitas Sebelas Maret*: 529-534
- Høvding, G. 2008. Acute bacterial conjunctivitis. *Acta Ophthalmol.* 86(1): 5–17
- Hydepark. 2010. Conjunctivitis. <http://hydepark-inf.plymouth.sch.uk/docs/Conjunctivitis.pdf> [Diakses pada 2 Oktober 2017]
- Ikapharmindo. 2014. Levofloxacin i.v. 500 mg/100 ml For i.v. Infusion. <http://www.ikapharmindo.com/download/Antibiotik%20dan%20Generik/LEVOFLOXACIN.pdf> [Diakses pada 3 September 2017]
- Ilyas, S., dan S.R. Yulianti. 2014. *Ilmu Penyakit Mata*. Jakarta: Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia
- Jawetz, Melnick, dan Adelberg's. 2008. *Mikrobiologi Kedokteran*. Jakarta: Salemba Medika
- JEFCA (Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives). 2006. Consideration of maximum residue limits (MRL) for veterinary drugs. 66th JEFCA meeting. CX/RV DF 06/16/7, add 1. Food Standards Programme Codex Committee on Residues of veterinary Drugs in Foods
- Jurian, V.Y., S. Suwasono dan M. Fauzi. 2016. Aktivitas Antioksidan dan Antibakteri Ekstrak Daun Murbei (*Morus alba L.*) terhadap *Escherichia coli*. *Prosiding Seminar Nasional APTA*. 26-27 Oktober 2016. APTA
- Kemendes RI. 2010. *10 Besar Penyakit Rawat Jalan Tahun 2009*. Profil Kesehatan Indonesia Tahun 2009. <http://www.Depkes.go.id> [Diakses pada 6 Juni 2017]
- Kim S. Y., J.J. Gao, dan H.K. Kang .2000. Two flavonoids from the leaves of *Morus alba* induce differentiation of the human promyelocytic leukemia (HL-60) cell line, *Biol Pharm Bull.* 23(4):451-5
- Kugadas, A., S.H. Christiansen, S. Sankaranarayanan, N.K. Surana, S. Gauguet, R. Kunz, R. Fichorova, T. Vorup-Jensen, dan M. Gadjeva. 2016. Impact of microbiota on resistance to ocular *Pseudomonas aeruginosa*-induced keratitis. *PLOS Pathog.* 12
- Liesegang T.J., T.A. Deutsch, dan M.G. Grand. 2001. Basic and clinical science course, fundamentals and principles of ophthalmology, section 2, 2001-2002.

- The Foundation of the American Academy of Ophthalmology*. 37-9, 45-51, 302-10, 387-93
- Liu, X.G., W. Xiao, Y. Chen, Xu, dan J. Wu. 2004. Quantification and Purification of Mulberry Anthocyanins with Macroporous Resins. *J. Biomed Biotechnol.* (5): 326-331
- Lolowang, M. 2014. Pola Bakteri Aerob Penyebab Konjungtivitis pada Penderita Rawat Jalan di Balai Kesehatan Mata Masyarakat Kota Manado. <https://ejournal.unsrat.ac.id/index.php/ebiomedik/article/download/3760/3283> [Diakses pada 26 Oktober 2017]
- Mahon, C.R., D.C. Lehman, dan G. Manuselis. 2011. *Textbook of Diagnostic Microbiology*. New York: Saunders Elsevier
- Manek, D.P. 2017. Uji Aktivitas Infus Kunyit (*Curcuma longa*) terhadap Waktu Penyembuhan dan Tingkat Iritasi Mata Tikus Secara Makroskopis yang Diinduksi *Staphylococcus aureus*. *Skripsi*. Surabaya: Universitas Katolik Widya Mandala Surabaya
- Mannis, M.J., dan R.D. Plotnik. 2005. Bacterial Conjunctivitis. In: *Tasman M & Jaeger EA (eds) Duane's Clinical Ophthalmology*, vol. 4. Philadelphia: Lippincott, Williams & Wilkins, 1–11.
- McGilligan, V.E., M.S. Gregory-Ksander, D. Li, J.E. Moore, R.R. Hodges, M.S. Gilmore, T.C. Moore, dan D.A. Dartt. 2013. *Staphylococcus aureus* activates the NLRP3 inflammasome in human and rat conjunctival goblet cells. *PLoS ONE*. 8
- Medicastore. 2016. Cendo Lyteers Tetes Mata 15 ML. <http://apotik.medicastore.com/obat/cendo-lyteers-tetes-mata-15-ml> [Diakses pada 14 Januari 2018]
- Mino de Kaspar, H., T.C. Kreutzer, I. Aguirre-Romo, C.N. Ta, dan J. Dudichum. 2008. A prospective randomized study to determine the efficacy of preoperative topical levofloxacin in reducing conjunctival bacterial flora. *Am J Ophthalmol.* 145: 136–142.
- Moore, K.L., A.F. Dalley, dan A.M. Agur. 2010. *Clinically Oriented Anatomy*. Philadelphia: Lippincott William and Wilkins. 6 th edition. p. 889-909
- Musawwir. 2014. Daya Hambat Antibakteri Daun Murbei (*Morus alba*) dan Penggunaannya sebagai Konsentrat terhadap Performa Ayam Buras Petelur. *Skripsi*. Makassar: Fakultas Peternakan Universitas Hasannudin.

- Oliveira. 2015. Evaluation of Toxicity and Antimicrobial Activity of an Ethanolic Extract from Leaves of *Morus alba* L. (Moraceae).
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4515285/> [Diakses pada 22 September 2017]
- Oliver, G.F., G.A. Wilson, dan R.J. Everts. 2009. Acute infective conjunctivitis: evidence review and management advice for New Zealand practitioners. *The New Zealand Medical Journal*. 122: 69-75
<http://www.nzma.org.nz/journal/122-1298/3688> [Diakses pada 11 Juni 2017]
- Pandia, S.A. 2017. *Staphylococcus aureus*.
http://eprints.undip.ac.id/46226/3/Sabila_Audigna_22010111130069_Lap.KT_I_Bab2.pdf [Diakses pada 17 September 2017]
- Pavan, D., dan Langston. 1981. *Manual of Ocular Diagnosis and Therapy*. Boston. Little, Brow and Company, First edition. Fourth printing. p.76. Table 5-2
- Pratama, N.R., dan A. Widiyantoro. 2014. Murbei (*Morus alba* L.).
http://ccrc.farmasi.ugm.ac.id/?page_id=2317 [Diakses pada 9 Mei 2017]
- Pelczar, M.J., dan E.C. Chan. 2005. *Dasar-Dasar Mikrobiologi*. Jakarta: UI Press
- Permadi, A. 2006. *Tanaman Obat Pelancar Air Seni*. Jakarta: Penebar Swadaya.
- Rosenbach, J. 1884. *Mickro-organismen bei den Wund-Infections-Krankheiten des Menschen*. Wiesbaden: J. F. Bergmann
- Rubenstein, J.B. 1999. *Disorders of The Conjunctiva and Limbus*. In: Yanoff M & Du- ker JS (eds) *Ophthalmology*. St Louis: Mosby, 12–18.
- Sanjoyo, R. 2017. Obat (Biomedik Farmakologi).
<http://yoyoke.web.ugm.ac.id/download/obat.pdf> [Diakses pada 11 Juni 2017]
- Sugandi, E., dan Sugiarto. 1993. *Rancangan Percobaan*. Yogyakarta: Andi Offset
- Sugiyono. 2012. *Metode Penelitian Kuantitatif Kualitatif dan R&D*. Bandung: Alfabeta. Hal. 107
- Sunanto, H. 2009. *100 Resep Sembuhkan Hipertensi, Obesitas dan Asam Urat*. Jakarta: PT. Gramedia
- Tampi, G.G., dan T. Nugroho. 2011. Rasionalitas Penggunaan Antibiotika dalam Penatalaksanaan Konjungtivitis di Bagian Mata RSUP DR. Kariadi Semarang.
<http://eprints.undip.ac.id/33301/> [Diakses pada 11 Februari 2018]

- Tano, Y. 2008. Memilih Antibiotik Paling Efektif untuk Infeksi Mata.
[http://ferronpharma.com/sites/default/files/CRAVIT Antibiotik Untuk Infeksi Mata_0.pdf](http://ferronpharma.com/sites/default/files/CRAVIT_Antibiotik_Untuk_Infeksi_Mata_0.pdf) [Diakses pada 3 September 2017]
- Vaughan, D., dan T. Asbury. 2015. *Vaughan & Asbury Oftalmologi Umum*. Jakarta: Buku Kedokteran EGC.
- Vaughan, D., dan T. Asbury. 1983. *General Ophthalmology*. Singapore. Maruzen Asian edition. 10 th edition. p.63. Table 7-1. Differentiation of the common types of conjunctivitis.
- Wang, W., Y. Zu, Y. Fu, dan T. Efferth. 2012. In vitro antioxidant and antimicrobial activity of extracts from *Morus alba* L. leaves, stems and fruits. *Am J Chin Med*. 40(2): 349
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22419428> [Diakses pada 3 Maret 2018]
- Warsa, U.C. 2011. *Buku Ajar Mikrobiologi Kedokteran: Kokus Positif Gram Staphylococcus*. Jakarta: Binarupa Aksara
- Yeung, K.K. 2017. Bacterial Conjunctivitis.
<http://emedicine.medscape.com/article/1191730-overview> [Diakses pada 17 September 2017]

LAMPIRAN

Lampiran 3.1 *Etichal Clearance*

KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI DAN PENDIDIKAN TINGGI

UNIVERSITAS JEMBER

KOMISI ETIK PENELITIAN

Jl. Kalimantan 37 Kampus Bumi Tegal Boto Telp/Fax (0331) 337877 Jember 68121 – Email :
fk_unej@telkom.net**KETERANGAN PERSETUJUAN ETIK***ETHICAL APPROVA*

Nomor : 1.148 /H25.1.11/KE/2018

Komisi Etik, Fakultas Kedokteran Universitas Jember dalam upaya melindungi hak asasi dan kesejahteraan subyek penelitian kedokteran, telah mengkaji dengan teliti protokol berjudul :

The Ethics Committee of the Faculty of Medicine, Jember University, With regards of the protection of human rights and welfare in medical research, has carefully reviewed the proposal entitled :

**PENGARUH EKSTRAK DAUN MURBEI (*Morus alba L.*) TERHADAP TIKUS WISTAR
MODEL KONJUNGTIVITIS KARENA *Staphylococcus aureus***

Nama Peneliti Utama : Gama Wisnu Sanjaya
Name of the principal investigator

NIM : 142010101022

Nama Institusi : Fakultas Kedokteran Universitas Jember
Name of institution

Dan telah menyetujui protokol tersebut diatas.
And approved the above mentioned proposal.

Jember, 09 Februari 2018

Ketua Komisi Etik Penelitian



dr. Rini Riyanti, Sp.PK

Tanggapan Anggota Komisi Etik

(Diisi oleh Anggota Komisi Etik, berisi tanggapan sesuai dengan butir-butir isian diatas dan telaah terhadap Protokol maupun dokumen kelengkapan lainnya)

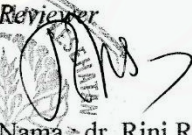
Review Proposal :

1. Pemilihan, perawatan, perlakuan, pengorbanan dan pemusnahan hewan coba mengacu pada buku pedoman etik penelitian kesehatan (Penggunaan hewan coba dengan prinsip 3R : *Reduced, Reused, Redefined*)
2. Mohon diperhatikan kontrol kualitas pembuatan ekstrak etanol daun murbei agar didapatkan kadar yang sesuai.
3. Mohon diperhatikan kontrol kualitas di bidang mikrobiologi.
4. Mohon diperhatikan pembuangan limbah medis dan limbah B3 agar tidak mencemari lingkungan.

Mohon di perhatikan pada proposal :

- Tata cara pembuangan limbah mikrobiologi

Jember, 19 Januari 2018

Reviewer

Nama : dr. Rini Riyanti, Sp.PK

Lampiran 3.2 Surat Izin Penelitian



KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI, DAN PENDIDIKAN TINGGI
UNIVERSITAS AIRLANGGA
FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
Kampus C Mulyorejo Surabaya 60115 Telp. (031) 5992785, 5993016 Fax (031) 5993015
Website: <http://www.fkh.unair.ac.id>; e-mail: info@fkh.unair.ac.id

Nomor : 5605 / UN3.1.6 / PS / 2017. 21 Desember 2017
Perihal : Ijin Penelitian

Yth.
Gama Wisnu Sanjaya
NIM. 142010101022
Fakultas Kedokteran
Universitas Jember
Jember

Sehubungan dengan surat saudara Nomor : 2153/UN25.1.11/LT/2017, tanggal 01 November 2017, perihal permohonan peminjaman kandang hewan coba untuk penelitian, bersama ini diberitahukan bahwa pada prinsipnya kami dapat memberikan ijin peminjaman kandang hewan coba di Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga untuk mendukung penelitian tersebut dengan catatan menjaga ketertiban dan mentaati ketentuan yang berlaku di FKH Unair.

Atas perhatian saudara, kami sampaikan terima kasih.


Dekan
Wakil Dekan II
Dr. Mufasirin, Drh., M.Si
NIP. 196711071993031003

Tembusan Yth :
1. Dekan FKH Unair
2. Ketua Kandang Hewan Coba FKH Unair



Lampiran 3.3 Surat Keterangan dan Uji Determinasi Tanaman

SURAT KETERANGAN

Yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : dr. Cicih Komariah, Sp. M
Alamat : Fakultas Kedokteran Universitas Jember
Pekerjaan : Dosen Pembimbing Utama Bidang Farmakologi

Menerangkan bahwa :

Nama, NIM : Gama Wisnu Sanjaya (142010101022)
Ema Fawziyah Ulfah (142010101029)
Bagus Aditya Ansharullah (142010101081)

Disampaikan kepada : Gama Wisnu Sanjaya
NIM : 142010101022
Perguruan Tinggi : Fakultas Kedokteran Universitas Jember

Sehubungan dengan surat dengan Nomor : 6022/UN25.1.3/PS.8/2017, tanggal 20 Nopember 2017 atas nama Ema Fawziyah Ulfah (142010101029) menyatakan bahwa Hasil Identifikasi Tanaman Murbei (*Morus alba* L.) adalah sama dengan penelitian Gama Wisnu Sanjaya (142010101022) dan Bagus Aditya Ansharullah (142010101081). Demikian surat keterangan ini dibuat untuk dapat dipergunakan sebagaimana mestinya.

Jember, 12 Februari 2018
Mengetahui,
Dosen Pembimbing Utama

dr. Cicih Komariah, Sp. M



KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI DAN PENDIDIKAN TINGGI
UNIVERSITAS JEMBER

FAKULTAS PERTANIAN

Jl. Kalimantan Kampus Tegalboto, Jember 68121. Telp.: (0331) 334054, 339596
Fax.: (0331) 338422, e-mail: admin.faperta@unej.ac.id

Nomor : 6022/UN25.1.3/PS.8/2017
Lampiran : 2 (lembar) lembar
Hal : Hasil Identifikasi Tanaman

20 Nopember 2017

Yth. : Wakil DEKAN I
Fakultas Kedokteran
Universitas Jember

Menindaklanjuti surat saudara Nomor: 2061/UN25.1.11/LT/2017, tanggal 23 Oktober 2017 tentang Permohonan Ijin Penelitian untuk identifikasi tanaman, maka bersama ini kami sampaikan hasil identifikasi morfologis 1 (satu) set contoh tanaman lengkap yang terdiri dari daun, batang, bunga dan buah (terlampir) dalam rangka penyusunan skripsi, atas nama:

Nama : Ema Fawziah Ulfah
N.I.M. : 142010101029

Atas kepercayaannya disampaikan terimakasih.



Wakil Dekan II,

Dr. R. Soedradjad, M.T.
NIP. 195707181984031001

Tembusan:

1. Mahasiswa yang bersangkutan

HASIL IDENTIFIKASI MORFOLOGIS CONTOH TUMBUHAN

1.	MORFOLOGI DAUN	
	a. Bangun Daun	Delta (<i>deltoideus</i>)
	b. Tepi Daun	Bergerigi (<i>serratus</i>)
	c. Pangkal Daun	Membulat (<i>rotundus</i>)
	d. Ujung Daun	Meruncing (<i>acuminatus</i>)
	e. Tulang Daun	Menyirip (<i>penninervis</i>) dan menonjol pada bagian bawah permukaan daun
	f. Permukaan Atas	Agak Kasap
	g. Permukaan Bawah	Kasap
	h. Bentuk Tangkai Daun	Bulat
	i. Warna Daun	Hijau
	j. Duduk Daun	Berselang-seling
	k. Jenis Daun	Tunggal (<i>folium simplex</i>)
2.	MORFOLOGI BATANG	
	a. Bentuk Batang	Bulat (<i>teres</i>)
	b. Permukaan Batang	Kasar
	c. Arah Tumbuh	Tegak ke atas (<i>erectus</i>)
	d. Percabangan	Monopodial (batang pokok tampak jelas)
3.	MORFOLOGI AKAR	
	Sistem perakaran	Akar tanaman tidak disertakan sehingga tidak teridentifikasi
4.	MORFOLOGI BUNGA	
	a. Bunga berwarna hijau kekuningan.	
	b. Uniseksual berkelamin tunggal.	
	c. Jumlah kelopak 4 (empat).	
	d. Mahkota berbentuk taji.	
5.	MORFOLOGI BUAH	
	a. Merupakan kurung (<i>achene</i>).	
	b. Bentuk bulat memanjang secara agregat.	
	c. Berwarna hijau	
	d. Pangkal buah tumpul	
	e. Ujung buah tumpul	
6.	MORFOLOGI BIJI	Biji tanaman tidak disertakan sehingga tidak teridentifikasi
7.	MODIFIKASI ORGAN	
	a. Jenis Modifikasi	Tidak ada
	b. Lain-Lain	Tidak ada

Kesimpulan:

Berdasar ciri morfologis yang ada, khususnya pada karakter daun, batang, bunga, dan buah, tumbuhan tersebut benar tumbuhan Murbei (*Morus Alba L.*).

Jember, 20 Nopember 2017
Pelaksana Identifikasi
PLP Laboratorium Agronomi,



Muhammad Sugiono
NIP. 196712182001121001

Tanaman yang di Identifikasi



Permukaan bagian Bawah (kiri) dan Atas (kanan)



Duduk Daun

DAUN TANAMAN



Batang Tanaman



Bunga Tanaman



Buah Tanaman

Jember, 20 Nopember 2017
Pelaksana Identifikasi
PLP Laboratorium Agronomi,

Muhammad Sugiono
NIP. 196712182001121001

Lampiran 3.4 Surat Keterangan Sehat Hewan Laboratorium

SURAT KETERANGAN

Yang bertanda tangan di bawah ini :

Nama : Supardi
Alamat : Fakultas Kedokteran Hewan Unair, Jl. Mulyosari Kampus C
Pekerjaan : Pemelihara Hewan Laboratorium

Menerangkan bahwa :

Jenis : Tikus (*Rattus Norvegicus*)
Strain : Wistar
Umur : 2 – 3 bulan
Jenis Kelamin : Jantan
Berat Badan : 150 – 200 gram
Jumlah : 24 ekor
Disampaikan kepada : Gama Wisnu Sanjaya
NIM : 142010101022
Perguruan Tinggi : Fakultas Kedokteran Universitas Jember

Kondisi hewan Laboratorium tersebut : Sehat, tidak cacat dan tidak terjangkit penyakit.
Bisa digunakan dalam penelitiannya mulai tanggal 22 Desember 2017 – 11 Januari 2018. Judul penelitian ‘ Pengaruh Ekstrak Daun Murbei (*Morus Alba L.*) Terhadap Tikus Wistar Model Konjungtivitis karena *Staphylococcus aureus*.
Demikian surat keterangan ini dibuat untuk dapat dipergunakan sebagaimana mestinya.

Surabaya, 15 Desember 2018

Mengetahui,
Pemeriksa,


Dr. Iwan Sahrial Hamid, MSi., drh.


Pemelihara Ternak,
Supardi

Lampiran 3.5 Perhitungan Dosis Ekstrak dan Dosis Hewan Coba

1. Pemberian ekstrak (tiap kelompok) selama 7 hari ke tikus wistar:
1 kelompok membutuhkan: 4 tikus x 7 hari x 2 tetes: 56 tetes
1 tetes (0,075 ml): 56 x 0,075 ml: 4,2 ml
(dibuat 10 ml (5,8 ml cadangan) dalam botol cendo lyteers 15 ml)

2. Dosis ekstrak daun murbei (*Morus alba* L.) dalam akuades:
 - a. Dosis 45%: $45/100 \times 10$ ml: 4,5 gram ekstrak
(ditambah akuades sampai menjadi 10 ml)


 - b. Dosis 55%: $55/100 \times 10$ ml: 5,5 gram ekstrak
(ditambah akuades sampai menjadi 10 ml)

 - c. Dosis 65%: $65/100 \times 10$ ml: 6,5 gram ekstrak
(ditambah akuades sampai menjadi 10 ml)

 - d. Dosis 75%: $75/100 \times 100$ ml: 7,5 gram ekstrak
(ditambah akuades sampai menjadi 10 ml)


(jumlah total ekstrak yang dibutuhkan: 24 gram)
(jumlah total ekstrak yang dipunya: 27,77 gram)

Lampiran 4.1 Data TPC *Staphylococcus aureus*



KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI DAN PENDIDIKAN TINGGI
UNIVERSITAS NEGERI SURABAYA
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
JURUSAN BIOLOGI

Kampus Ketintang
Jalan Ketintang Gedung C3 Lt. 2,
Surabaya 60231
T: +6231-8298382
F: +6231-8298382



Surabaya, 15 Januari 2018

Nomor : /UN38.3.4.4/DL/2018
Lampiran : -
Perihal : Hasil analisis TPC Bakteri *S. aureus*

Hasil Uji Analisa Total Plate Count Bakteri

Judul Penelitian : Efek Ekstrak Etanol Daun Murbei (*Morus alba* L.) pada Tikus Wistar Model Konjungtivitis oleh *Staphylococcus aureus*
Metode Uji : Total Plate Count
Jumlah Sampel Total : 24 x 7 = 168 sampel
Pemilik Sampel : Gama Wisnu Sanjaya
Instansi : Fakultas Kedokteran Universitas Jember

Jenis Sampel :

- K (-) Kontrol negatif (Cendo lyteers)
- K(+) Kontrol positif
- P(1) Pemberian ekstrak daun murbei 45%
- P(2) Pemberian ekstrak daun murbei 55%
- P(3) Pemberian ekstrak daun murbei 65%
- P(4) Pemberian ekstrak daun murbei 75%
- Setiap Perlakuan di ulang 4 kali

Hasil Uji :
Tabel 1. Total Plate Count Bakteri *S. aureus* penyebab konjungtivitis pada Sampel mata tikus yang diobati dengan Ekstrak daun murbei (adaptasi hari ke 7)

Kelompok Perlakuan	Σ <i>Staphylococcus aurues</i> (Hari-7) (10 ³ CFU/ mata)				
	Ulangan 1	Ulangan 2	Ulangan 3	Ulangan 4	rata-rata
K (-)	2,75	4,75	4,75	3,25	3,88
K (+)	3,50	3,75	2,75	4,75	3,69
P1 (45%)	3,50	2,75	3,00	6,25	3,88
P2 (55%)	2,05	3,75	4,75	3,50	3,51
P3 (65%)	8,25	10,75	9,50	8,50	9,25
P4 (75%)	8,25	8,00	6,75	2,25	6,31

www.unesa.ac.id | "Growing with character"



KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI DAN PENDIDIKAN TINGGI
UNIVERSITAS NEGERI SURABAYA
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
JURUSAN BIOLOGI

Kampus Ketintang
Jalan Ketintang Gedung C3 Lt. 2,
Surabaya 60231
T: +6231-8298382
F: +6231-8298382



Tabel 2. Total Plate Count Bakteri *S. aureus* penyebab konjungtivitis pada Sampel mata tikus yang diobati dengan Ekstrak daun murbei (Induksi H+1 (10^6 CFU/ml))

Kelompok Perlakuan	Σ <i>Staphylococcus aureus</i> (Hari-9) (10^3 CFU/ mata)				
	Ulangan 1	Ulangan 2	Ulangan 3	Ulangan 4	rata-rata
K (-)	26,00	37,50	30,00	37,50	32,75
K (+)	34,25	11,25	85,00	12,50	35,75
P1 (45%)	45,00	34,25	35,00	34,25	37,13
P2 (55%)	18,00	30,00	52,50	37,50	34,50
P3 (65%)	51,00	19,25	62,50	14,50	36,81
P4 (75%)	10,50	15,50	75,00	37,50	34,63

Tabel 3. Total Plate Count Bakteri Bakteri *S. aureus* penyebab konjungtivitis pada Sampel mata tikus yang diobati dengan Ekstrak daun murbei (Induksi H+3 (10^6 CFU/ml))

Kelompok Perlakuan	Σ <i>Staphylococcus aureus</i> (Hari-11) (10^4 CFU/ mata)				
	Ulangan 1	Ulangan 2	Ulangan 3	Ulangan 4	rata-rata
K (-)	67,50	70,00	30,00	37,50	51,25
K (+)	46,00	44,00	79,75	71,50	60,31
P1 (45%)	22,25	60,00	27,50	70,00	44,94
P2 (55%)	52,50	50,00	40,00	32,50	43,75
P3 (65%)	57,50	57,50	85,00	77,75	69,44
P4 (75%)	47,00	48,75	65,00	36,00	49,19



KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI DAN PENDIDIKAN TINGGI
UNIVERSITAS NEGERI SURABAYA
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
JURUSAN BIOLOGI

Kampus Ketintang
Jalan Ketintang Gedung C3 Lt. 2,
Surabaya 60231
T: +6231-8298382
F: +6231-8298382



Tabel 4. Total Plate Count Bakteri *S. aureus* penyebab konjungtivitis pada Sampel mata tikus yang diobati dengan Ekstrak daun murbei (Induksi H+1 obat)

Kelompok Perlakuan	Σ <i>Staphylococcus aureus</i> (Hari-13) (10^4 CFU/ mata)				
	Ulangan 1	Ulangan 2	Ulangan 3	Ulangan 4	rata-rata
K (-)	34,00	37,50	38,50	45,00	38,75
K (+)	30,75	15,50	25,00	32,75	26,00
P1 (45%)	30,75	27,50	23,50	45,00	31,69
P2 (55%)	26,25	20,50	33,50	38,00	29,56
P3 (65%)	12,70	17,50	19,25	21,00	17,61
P4 (75%)	14,50	14,00	16,50	15,00	15,00

Tabel 5. Total Plate Count Bakteri *S. aureus* penyebab konjungtivitis pada Sampel mata tikus yang diobati dengan Ekstrak daun murbei (Induksi H+3 obat)

Kelompok Perlakuan	Σ <i>Staphylococcus aureus</i> (Hari-15) (10^3 CFU/ mata)				
	Ulangan 1	Ulangan 2	Ulangan 3	Ulangan 4	rata rata
K (-)	37,75	38,25	32,75	25,03	33,44
K (+)	30,00	18,00	28,00	17,25	23,31
P1 (45%)	33,50	37,75	35,00	42,50	37,19
P2 (55%)	25,75	30,75	20,75	50,00	31,81
P3 (65%)	12,75	10,25	9,75	18,00	12,69
P4 (75%)	12,75	15,00	8,25	11,50	11,88



KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI DAN PENDIDIKAN TINGGI
UNIVERSITAS NEGERI SURABAYA
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
JURUSAN BIOLOGI

Kampus Ketintang
Jalan Ketintang Gedung C3 Lt. 2,
Surabaya 60231
T: +6231-8298382
F: +6231-8298382



Tabel 6. Total Plate Count Bakteri Sampel Ekstrak daun murbei terhadap *S. aureus* penyebab konjungtivitis (Induksi H+5 obat)

Kelompok Perlakuan	Σ <i>Staphylococcus aureus</i> (Hari-17) (10^3 CFU/ mata)				
	Ulangan 1	Ulangan 2	Ulangan 3	Ulangan 4	rata rata
K (-)	15,55	13,00	13,00	7,00	12,14
K (+)	2,03	2,18	2,33	1,70	2,06
P1 (45%)	4,28	6,75	6,50	7,25	6,19
P2 (55%)	5,80	20,75	3,00	5,43	8,74
P3 (65%)	3,58	21,50	5,00	2,33	8,10
P4 (75%)	18,25	2,10	2,75	3,00	6,53

Tabel 7. Total Plate Count Bakteri Bakteri *S. aureus* penyebab konjungtivitis pada Sampel mata tikus yang diobati dengan Ekstrak daun murbei (Induksi H+7 obat)

Kelompok Perlakuan	Σ <i>Staphylococcus aureus</i> (Hari-19) (10^3 CFU/ mata)				
	Ulangan 1	Ulangan 2	Ulangan 3	Ulangan 4	rata rata
K (-)	1,05	1,38	1,42	1,50	1,34
K (+)	1,05	1,53	2,40	1,48	1,61
P1 (45%)	5,88	5,25	4,40	3,75	4,82
P2 (55%)	6,25	5,40	6,86	4,10	5,65
P3 (65%)	1,05	1,26	1,16	1,05	1,13
P4 (75%)	1,56	2,40	1,40	2,48	1,96



KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI DAN PENDIDIKAN TINGGI
UNIVERSITAS NEGERI SURABAYA
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
JURUSAN BIOLOGI

Kampus Ketintang
Jalan Ketintang Gedung C Lt.2,
Surabaya 60231
T: +6231- 8298382
F: +6231- 8298382



Tabel 8. Rata-rata Total Plate Count Bakteri *S. aureus* penyebab konjungtivitis pada Sampel mata tikus yang diobati dengan Ekstrak daun murbei pada hari ke- 7 sampai 19

Kelompok Perlakuan	Rata- rata jumlah <i>Staphylococcus aureus</i> pada tikus konjungtivitis pada hari ke						
	7 (x10 ³ CFU/mata)	9 (x10 ³ CFU/mata)	11 (x10 ⁴ CFU/mata)	13 (x10 ⁴ CFU/mata)	15 (x10 ³ CFU/mata)	17 (x10 ³ CFU/mata)	19 (x10 ³ CFU/mata)
K (-)	3,88	32,75	51,25	38,75	33,44	12,14	1,34
K (+)	3,69	35,75	60,31	26,00	23,31	2,06	1,61
P1 (45%)	3,88	37,13	44,94	31,69	37,19	6,19	4,82
P2 (55%)	3,51	34,50	43,75	29,56	31,81	8,74	5,65
P3 (65%)	9,25	36,81	69,44	17,61	12,69	8,10	1,13
P4 (75%)	6,31	34,63	49,19	15,00	11,88	6,53	1,96

Keterangan :

Satuan TPC adalah CFU (Coloni For Unit)

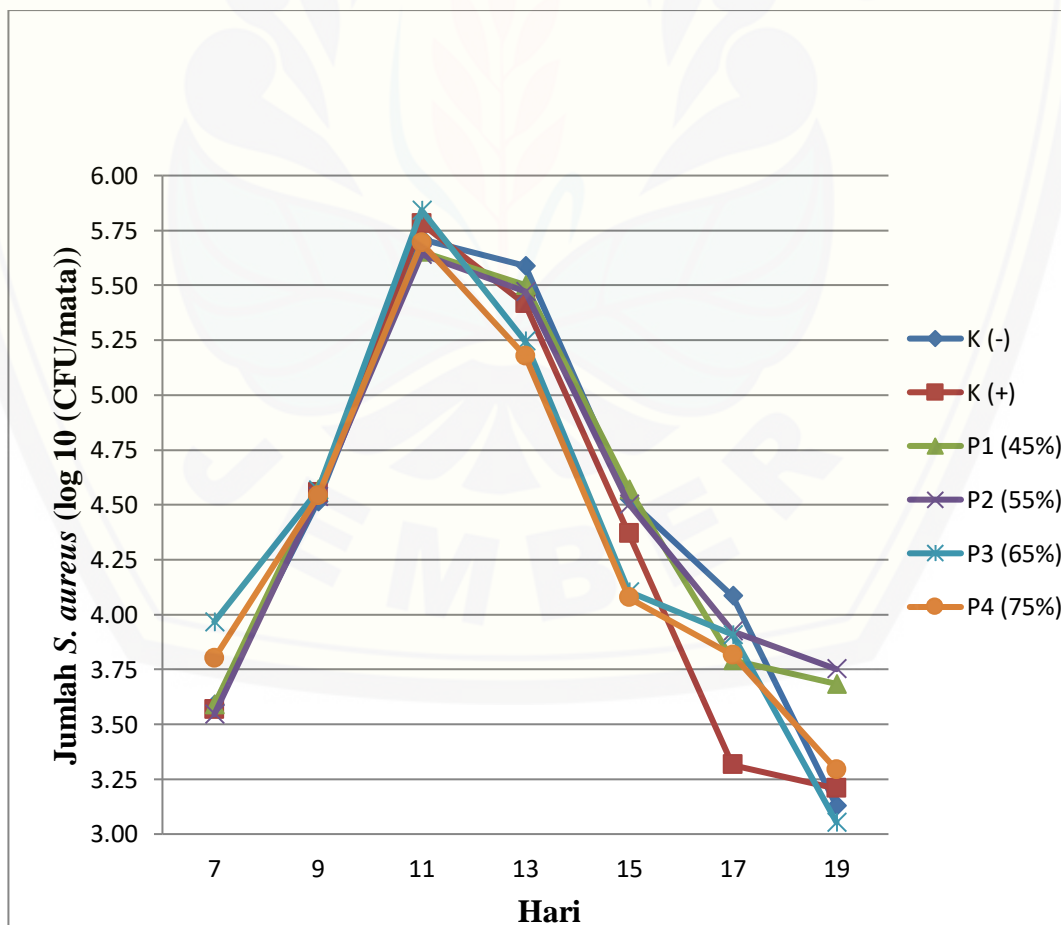
Media yang digunakan Medium selective differensial - MSA (Manitol Salt Agar)

Ketua Laboratorium
Jurusan Biologi FMIPA
Unesa Surabaya

Dr. Mahanani Tri Asri, M.Si
NIP. 196707241992032002

Lampiran 4.2 Tabel dan Grafik Hasil Logaritma TPC *Staphylococcus aureus*

Kelompok	Rata-rata jumlah <i>Staphylococcus aureus</i> pada tikus konjungtivitis pada hari ke						
	Sebelum			Jumlah koloni bakteri <i>S. aureus</i> setelah pemberian ekstrak daun murbei			
	Adaptasi	3 hari pasca induksi <i>S. aureus</i>		Pemberian ekstrak air daun murbei selama 7 hari			
	7 (CFU/mata)	9 (CFU/mata)	11 (CFU/mata)	13 (CFU/mata)	15 (CFU/mata)	17 (CFU/mata)	19 (CFU/mata)
K (-)	3,58	4,51	5,70	5,59	4,52	4,07	3,12
K (+)	3,56	4,40	5,78	5,40	4,36	3,31	3,19
P1	3,56	4,57	5,65	5,49	4,57	3,78	3,68
P2	3,53	4,51	5,63	5,46	4,48	3,82	3,75
P3	3,96	4,49	5,84	5,24	4,09	3,74	3,05
P4	3,75	4,42	5,69	5,18	4,07	3,63	3,28



Lampiran 4.3 Perbaikan Gejala Konjungtivitis setelah Pemberian Ekstrak

Kelompok	Hari 12	Hari 13	Hari 14	Hari 15	Hari 16	Hari 17	Hari 18	Hari 19	Hari 20
*K(-)	++++	++++	++++	++++	++++	++++	+++	++	+
*K(+)	++++	++++	++++	++++	+	+	+	+	+
*P1	++++	++++	++++	++++	+++	+++	++	+	+
*P2	++++	++++	++++	++++	+++	+++	+	+	+
*P3	++++	++++	++++	+++	++	++	+	+	+
*P4	++++	++++	++++	++	++	+	+	+	+

Lampiran 4.4 Uji Normalitas Data *Shapiro-Wilk*

Pretest-Posttest (Hari 11, 17)

Tests of Normality

	kelompok	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
pretest	K(-)	,266	4	.	,852	4	,232
	K(+)	,214	4	.	,956	4	,755
	P1	,226	4	.	,946	4	,691
	P2	,257	4	.	,916	4	,516
	P3	,306	4	.	,777	4	,066
	P4	,250	4	.	,944	4	,677
posttest	K(-)	,369	4	.	,829	4	,164
	K(+)	,233	4	.	,942	4	,666
	P1	,355	4	.	,807	4	,116
	P2	,320	4	.	,899	4	,425
	P3	,286	4	.	,897	4	,416
	P4	,382	4	.	,772	4	,061

a. Lilliefors Significance Correction

Lampiran 4.5 Uji Homogenitas *Lavene* dan Uji *Anova One Way*

Pretest-Posttest (Hari 11, 17)

Test of Homogeneity of Variances

	Levene Statistic	df1	df2	Sig.
pretest	2,332	5	18	,085
posttest	2,153	5	18	,105

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
pretest	Between Groups	,126	5	,025	6,146	,002
	Within Groups	,074	18	,004		
	Total	,200	23			
posttest	Between Groups	1,235	5	,247	2,849	,046
	Within Groups	1,561	18	,087		
	Total	2,795	23			

Descriptives

		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
						Lower Bound	Upper Bound		
						pretest	K(-)		
	K(+)	4	5,7775	,04856	,02428	5,7002	5,8548	5,73	5,84
	P1	4	5,6525	,04573	,02287	5,5797	5,7253	5,60	5,70
	P2	4	5,6325	,09708	,04854	5,4780	5,7870	5,51	5,72
	P3	4	5,8425	,04924	,02462	5,7641	5,9209	5,80	5,89
	P4	4	5,6900	,05099	,02550	5,6089	5,7711	5,62	5,74
	Total	24	5,7167	,09333	,01905	5,6773	5,7561	5,51	5,89
posttest	K(-)	4	4,0650	,14821	,07411	3,8292	4,3008	3,85	4,19
	K(+)	4	3,3125	,06021	,03010	3,2167	3,4083	3,23	3,37
	P1	4	3,7825	,10372	,05186	3,6175	3,9475	3,63	3,86
	P2	4	3,8225	,35462	,17731	3,2582	4,3868	3,48	4,32
	P3	4	3,7375	,41740	,20870	3,0733	4,4017	3,37	4,33
	P4	4	3,6250	,42876	,21438	2,9428	4,3072	3,32	4,26
	Total	24	3,7242	,34862	,07116	3,5770	3,8714	3,23	4,33

Lampiran 4.6 Uji Paired T-Test**Paired Samples Statistics**

	Mean	N	Std. Deviation	Std. Error Mean
Pair 1 pretest	5,7000	24	,15698	,03204
posttest	3,7242	24	,34862	,07116

Paired Samples Correlations

	N	Correlation	Sig.
Pair 1 pretest & posttest	24	-,064	,766

Paired Samples Test

	Paired Differences					t	df	Sig. (2-tailed)
	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	95% Confidence Interval of the Difference				
				Lower	Upper			
Pair 1 pretest - posttest	1,97583	,39141	,07990	+1,81056	+2,14111	24,730	23	,000

Lampiran 4.7 Uji *Post Hoc* LSD

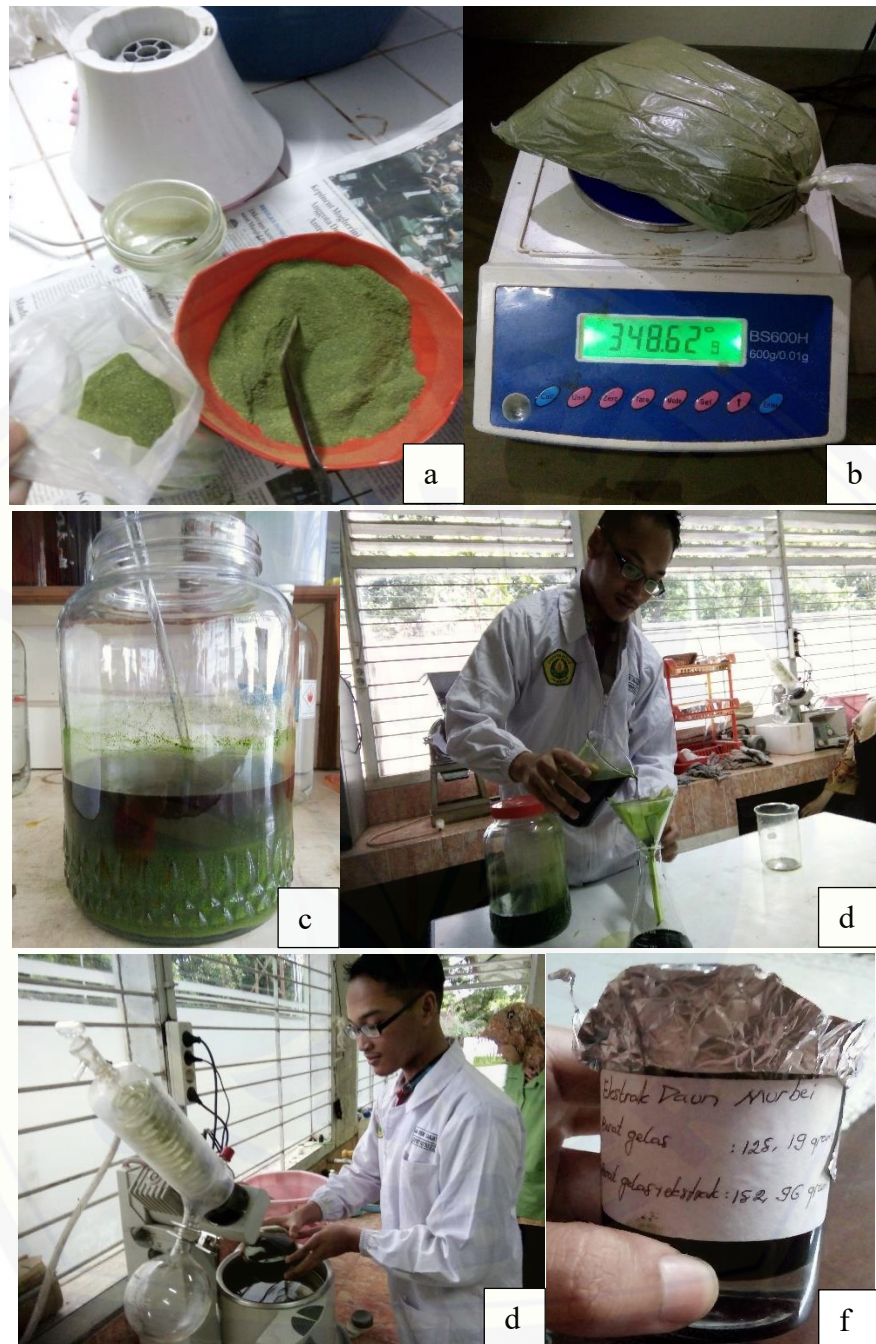
Multiple Comparisons

Dependent Variable: posttest

	(I) kelompok	(J) kelompok	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
LSD	K(-)	K(+)	,75250*	,20820	,002	,3151	1,1899
		P1	,28250	,20820	,192	-,1549	,7199
		P2	,24250	,20820	,259	-,1949	,6799
		P3	,32750	,20820	,133	-,1099	,7649
		P4	,44000*	,20820	,049	,0026	,8774
	K(+)	K(-)	-,75250*	,20820	,002	-1,1899	-,3151
		P1	-,47000*	,20820	,037	-,9074	-,0326
		P2	-,51000*	,20820	,025	-,9474	-,0726
		P3	-,42500	,20820	,056	-,8624	,0124
		P4	-,31250	,20820	,151	-,7499	,1249
	P1	K(-)	-,28250	,20820	,192	-,7199	,1549
		K(+)	,47000*	,20820	,037	,0326	,9074
		P2	-,04000	,20820	,850	-,4774	,3974
		P3	,04500	,20820	,831	-,3924	,4824
		P4	,15750	,20820	,459	-,2799	,5949
	P2	K(-)	-,24250	,20820	,259	-,6799	,1949
		K(+)	,51000*	,20820	,025	,0726	,9474
		P1	,04000	,20820	,850	-,3974	,4774
		P3	,08500	,20820	,688	-,3524	,5224
		P4	,19750	,20820	,355	-,2399	,6349
P3	K(-)	-,32750	,20820	,133	-,7649	,1099	
	K(+)	,42500	,20820	,056	-,0124	,8624	
	P1	-,04500	,20820	,831	-,4824	,3924	
	P2	-,08500	,20820	,688	-,5224	,3524	
	P4	,11250	,20820	,596	-,3249	,5499	
P4	K(-)	-,44000*	,20820	,049	-,8774	-,0026	
	K(+)	,31250	,20820	,151	-,1249	,7499	
	P1	-,15750	,20820	,459	-,5949	,2799	
	P2	-,19750	,20820	,355	-,6349	,2399	
	P3	-,11250	,20820	,596	-,5499	,3249	

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

Lampiran 4.8 Dokumentasi Penelitian



Proses pembuatan ekstrak daun murbei:
Mencari daun murbei 1,5 kg, Dicuci dengan akuades dan dikeringkan,
Dikeringkan dengan inkubator suhu 60°C, Diblender sampai jadi bubuk (a)
348,62 gram dengan timbangan digital (b) maserasi dengan etanol (c) penyaringan
(d) rotary evaporator (e) ekstrak daun murbei 27,77 gram(f)



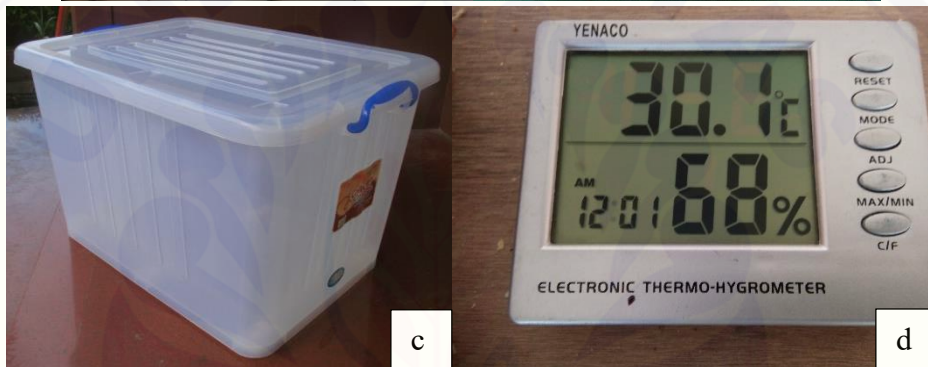
Proses pembuatan tetes mata ekstrak daun murbei:
 uji sterilitas ekstrak dalam media NA (a) sterilisasi botol tetes mata dengan alkohol dalam *laminar air flow* dan spiritus (b) penimbangan ekstrak sesuai konsentrasi 45%, 55%, 65% dan 75% (gr) (c) pengambilan akuades (d) penambahan akuades (100%-konsentrasi ekstrak dalam ml) (e) botol tetes mata ekstrak daun murbei steril (f)



Proses pembuatan *S. aureus* $1,5 \times 10^8$ CFU/ml:
5 ml media MSA miring (a) rekultur *S. aureus* dengan *streak* menggunakan ose dan media NB (*lactose broth*) (b) pengenceran dari media NB untuk mendapatkan *S. aureus* 10^8 CFU/ml (pengitungan bakteri dengan *hemisitometer*/TPC) (c) spuit berisi *S. aureus* 10^8 CFU/ml



Tempat penelitian Kandang Hewan Coba FKH UNAIR

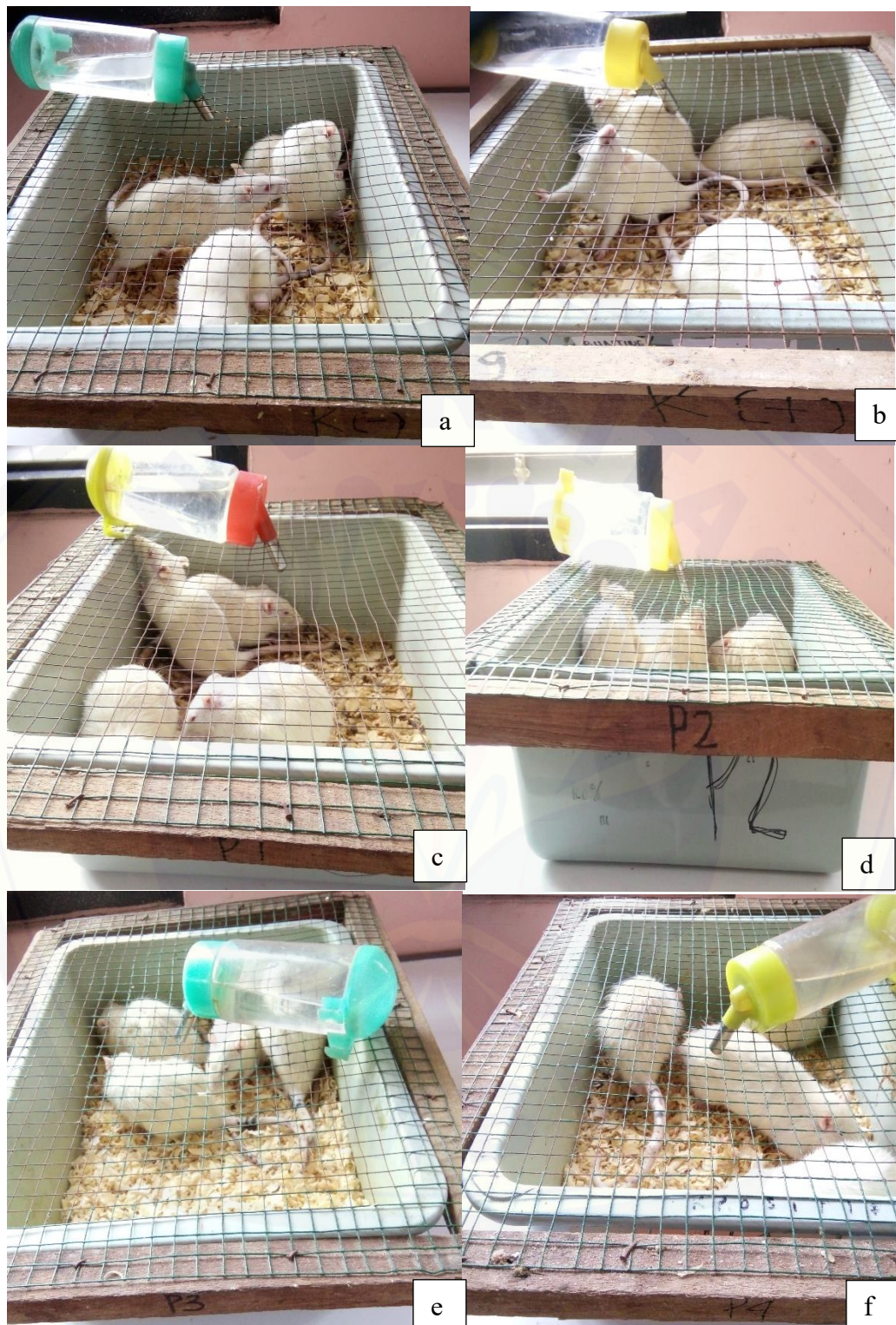


Alat penelitian:

autoklaf untuk sterilisasi alat dan media (a) inkubator (b) *box* berisi *dry ice* untuk sampel *swab* konjungtiva dan bakteri (c) *electronic thermo-hygrometer* (mengukur suhu dan kelembapan) (d) *colony counter* (mengitung TPC *S. aureus*) (e) *insenerator* (kremasi tikus konjungtivitis *S. aureus*) (f)



Perlakuan hewan laboratorium (tikus wistar) di FKH UNAIR:
 botol cendo lyteers 15 ml, levofloxacin 0,5%, 5 ml, ekstrak daun murbei (a) botol cendo lyteers 15 ml berisi 10 ml konsentrasi ekstrak daun murbei 45%, 55%, 65% dan 75% (b) sekam dan pelet (c) pemberian tetes mata ekstrak (d) adaptasi tikus (e) swab konjungtiva tikus wistar (f)



Tikus wistar 24 ekor terdiri dari:
4 ekor kelompok kontrol negatif (K(-)) (a) 4 ekor kelompok kontrol positif (K+) (b) 4 ekor kelompok ekstrak daun murbei berturut-turut adalah 45% (P1) (c) 55% (P2)(d) 65% (P3)(e) dan 75% (P4)(f)



Pembuatan TPC *S. aureus*:

4 ml botol vial sebanyak 25 buah berisi sampel *swab* konjungtiva tikus wistar (a)
1 ml dari botol vial dimasukkan ke tabung reaksi berisi 9 ml akuades dan diencerkan, 1 ml dari tabung reaksi diambil dengan spuit (b) sterilisasi ujung cawan petri dengan pembakar spiritus (c) pemberian 1 ml ke cawan petri (d) pemberian 9 ml media MSA (e) pengadukan cawan petri agar merata, lalu ujung cawan petri dilapisi *plastic wrap* (f)



Penghitungan TPC *S. aureus* menggunakan *colony counter*



Proses kremasi 24 tikus wistar setelah penelitian selesai:
botol berisi klorofom (a) klorofom dimasukkan ke dalam wadah kaca berisi tikus wistar (b) dibakar di *insenerator* dengan bahan bakar solar (c)