

**PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK DAUN KITOLOD TERHADAP
GAMBARAN HISTOPATOLOGI JARINGAN KONJUNGTIVA
PADA TIKUS WISTAR MODEL KONJUNGTIVITIS**

(Skripsi)

Oleh

ALFINA INDAH NABILA



**PROGRAM STUDI PENDIDIKAN DOKTER
FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS LAMPUNG
2023**

**PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK DAUN KITOLOD TERHADAP
GAMBARAN HISTOPATOLOGI JARINGAN KONJUNGTIVA
PADA TIKUS WISTAR MODEL KONJUNGTIVITIS**

Oleh

ALFINA INDAH NABILA

Skripsi

Sebagai Salah Satu Syarat Untuk Memperoleh Gelar

SARJANA KEDOKTERAN

Pada Fakultas Kedokteran Universitas Lampung



**PROGRAM STUDI PENDIDIKAN DOKTER
FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS LAMPUG
2023**

Judul Skripsi : **PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK DAUN KITOLOD TERHADAP GAMBARAN HISTOPATOLOGI JARINGAN KONJUNGTIVA PADA TIKUS WISTAR MODEL KONJUNGTIVITIS**

Nama Mahasiswa : *Affina Indah Nabila*

No. Pokok Mahasiswa : 1818011071

Program Studi : PENDIDIKAN DOKTER

Fakultas : KEDOKTERAN



Dr. Rani Himayani, S. Ked, Sp. M.
NIP 198312252009122004

Ramadhan Triyandi, S. Farm., M. Si., Apt.
NIP 198705202020121015

MENGETAHUI

Plt. Dekan Fakultas Kedokteran



Dr. Eng. Suripto Dwi Yuwono, S. Si., M.T.
NIP 197407052000031001

MENGESAHKAN

1. Tim Penguji

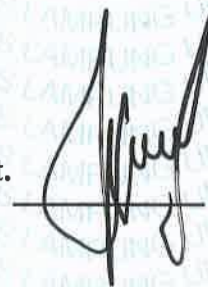
Ketua

: **dr. Rani Himayani, S. Ked, Sp. M.**



Sekretaris

: **Ramadhan Triyandi, S. Farm., M. Si., Apt.**



Penguji

Bukan Pembimbing

: **dr. Rizki Hanriko, S. Ked., Sp. PA**



2. Plt. Dekan Fakultas Kedokteran



Dr. Eng. Suropto Dwi Yuwono, S. Si., M.T.

NIP 197407052000031001

Tanggal Lulus Ujian Skripsi : **15 Juni 2023**

LEMBAR PERNYATAAN

Dengan ini saya mengatakan dengan sebenarnya, bahwa:

1. Skripsi dengan judul **“PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK DAUN KITOLOD TERHADAP GAMBARAN HISTOPATOLOGI JARINGAN KONJUNGTIVA PADA TIKUS WISTAR MODEL KONJUNGTIVITIS”** adalah hasil karya saya sendiri dan tidak melakukan penjiplakan atau pengutipan atas karya penulis lain dengan cara yang tidak sesuai dengan tata etika ilmiah yang berlaku dalam masyarakat akademik atau yang disebut plagiarisme.
2. Hal intelektualitas atas karya ilmiah ini diserahkan sepenuhnya kepada Universitas Lampung.

Demikian pernyataan saya, apabila di kemudian hari ditemukan adanya ketidakbenaran, saya bersedia menanggung akibat dan sanksi yang diberikan kepada saya.

Bandar Lampung, Juni 2023



Alfina Indah Nabila
Alfina Indah Nabila

RIWAYAT HIDUP

Penulis merupakan anak pertama dari enam bersaudara yang dilahirkan di Rimbo Bujang Jambi pada tanggal 24 Agustus 2000 dari Ayah Alfian, S. Pd. dan Ibu Fitriah.

Penulis menyelesaikan Pendidikan Taman Kanak-Kanak (TK) di TK Aisyiyah Bustanul Athfal pada tahun 2006, Sekolah Dasar (SD) diselesaikan di SD 73/VIII Perintis Rimbo Bujang pada tahun 2012, Sekolah Menengah Pertama (SMP) diselesaikan di MTsS Al-Fatah Rimbo Bujang pada tahun 2015, dan menyelesaikan Sekolah Menengah Atas (SMA) di SMAS Alfa Centaury Bandung pada tahun 2018.

Pada tahun 2018, penulis terdaftar sebagai mahasiswa Fakultas Kedokteran Universitas Lampung melalui jalur Seleksi Bersama Masuk Perguruan Tinggi Negeri (SBMPTN). Selama menjadi mahasiswa, penulis pernah aktif mengikuti organisasi Forum Studi Islam (FSI) Ibnu Sina periode 2019/2020 sebagai sekretaris Divisi Danus.

SANWACANA

Puji serta syukur penulis panjatkan kepada Allah SWT yang Maha Pengasih lagi Maha Penyayang yang telah melimpahkan rahmat dan karunia-Nya selama penyusunan skripsi ini sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “Pengaruh Pemberian Ekstrak Daun Kitolod Terhadap Gambaran Histopatologi Jaringan Konjungtiva Pada Tikus Wistar Model Konjungtivitis”.

Dalam proses penulisan skripsi ini, penulis mendapatkan bantuan, bimbingan, saran, kritik, dan dukungan dari berbagai pihak. Oleh karena itu, dalam kesempatan ini penulis ingin mengucapkan rasa terimakasih kepada:

1. Prof. Dr. Ir. Lusmeilia Afriani, D.E.A., I.P.M., selaku Rektor Universitas Lampung.
2. Dr. Eng. Suropto Dwi Yuwono, S. Si., M.T., selaku Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Lampung.
3. Dr. dr. Kahirun Nisa Berawi, S. Ked., M. Kes., AIFO-K, selaku Kepala Program Studi Fakultas Kedokteran Universitas Lampung.
4. dr. Rani Himayani, S. Ked., Sp. M., selaku Pembimbing I, yang telah membimbing penulis dengan sebaik-baiknya serta memberikan masukan dan motivasi yang sangat berharga bagi penulis, terimakasih banyak dokter atas waktu dan pelajaran yang telah diberikan.
5. Bapak Ramadhan Triyandi, S. Farm., M. Si., Apt., selaku Pembimbing II, yang telah memberikan kesediaan waktu untuk membimbing dan memberikan masukan selama proses penulisan skripsi, terimakasih banyak kepada Bapak karena telah memaklumi kekurangan penulis selama proses pembimbingan.

6. dr. Rizki Hanriko. S. Ked., Sp. PA, selaku penguji utama, terimakasih banyak atas waktu, saran, dan ilmu yang telah diberikan dalam proses penulisan skripsi ini.
7. dr. Waluyo Rudiyanto, S. Ked., M. Kes., Sp. KKLK yang telah memberikan bimbingan dan masukan dalam pengamatan dan perhitungan jumlah sebulan neutrofil sehingga pengamatan dapat dilakukan dengan baik.
8. Dr. dr. Syazili Mustofa, S. Ked., M. Biomed, selaku Pembimbing Akademik. Terimakasih telah membimbing penulis dengan sebaik-baiknya serta memberikan masukan dan motivasi yang sangat berharga bagi penulis.
9. Seluruh dosen, staf, dan karyawan Fakultas Kedokteran Universitas Lampung atas ilmu, waktu, dan bantuan yang telah diberikan selama proses perkuliahan sampai penyusunan skripsi
10. Kepada kedua orang tua penulis, Ayah (Alfian, S. Pd.) dan Ibu (Fitriah), terimakasih atas segala doa, nasihat, kasih sayang, dan semangat yang terus diberikan kepada penulis sehingga tetap kuat menjalani proses perkuliahan sampai penyusunan skripsi ini.
11. Kepada adik-adik penulis, terimakasih telah menjadi penyemangat dan atas doa bagi penulis.
12. Sahabat seperjuangan penulis yang selalu menemani selama proses perkuliahan dan dalam setiap kesulitan, terimakasih banyak Deana Rifqoh Nabilah, Nabila Rayhan Yasmin, Alyzah Nabila Miranda, Putri Nuraini Yahmal, dan Atika Rahmawati.
13. Teman satu penelitian, Retno Mareintika, terimakasih banyak atas kerja sama dan bantuan yang diberikan selama proses pengerjaan skripsi.
14. Sahabat yang telah terjalin dari masa SMA, Rika Aprilia dan Titis Hannisa, terimakasih atas doa dan motivasi yang diberikan selama masa perkuliahan.
15. Teman-teman angkatan 2018 (FIBRINOGEN) yang namanya tidak dapat penulis sebutkan satu per satu, terimakasih atas bantuan dan dukungan selama proses perkuliahan.

Semoga segala bantuan dan kebaikan yang telah diberikan kepada penulis dalam menyelesaikan skripsi ini akan mendapatkan balasan yang berlipat dan senantiasa selalu dikaruniai oleh rahmat Allah SWT. Aamiin Ya Robbal 'Alamiin.

Bandar Lampung, 2023

Penulis
Alfina Indah Nabila

ABSTRACT

THE EFFECT OF KITOLOD LEAVES EXTRACT ON CONJUNCTIVAL TISSUE HISTOPATHOLOGY IN WISTAR RATS MODEL OF CONJUNCTIVITIS

By

Alfina Indah Nabila

Background: The content of secondary metabolites in kitolod leaves has antimicrobial, anti-inflammatory and antioxidant activities, which in in vitro study have been shown that it can inhibit the growth of *Staphylococcus aureus* bacteria. Thus far, there had not any researches been done yet about the effect of kitolod leaves in in vivo study.

Method: This research is an experimental study with a post test only control design. The research was conducted for 15 days on 25 Wistar rats that randomly divided into 5 groups. The groups are K- (aquades 2 drops 4 times a day), K+ (chloramphenicol 0,5% 2 drops 4 times a day), P1, P2, dan P3 (Kitolod leaves extract with some concentration, there are 37,5%; 75%; and 150% that was administered 2 drops for 4 times a day). The dependent variable of this research was the histopathological appearance of the rat's conjunctival.

Results: The highest number of neutrophils occurred in group P1 (410), followed by K-, P2, K+ and P3 (343, 340, 263, and 261). Analysis using Kruskal-Wallis showed p value = 0,023 ($p < 0,05$). Post Hoc Mann-Whitney test showed a significant differences between K+ vs P1, P1 vs P2, and P1 vs P3 ($p < 0,05$).

Conclusion: There is an effect of kitolod leaves on conjunctival tissue histopathology in Wistar rats model of conjunctivitis.

Keywords: Conjunctivitis, kitolod leaves, neutrophils, *Staphylococcus aureus*

ABSTRAK

PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK DAUN KITOLOD TERHADAP GAMBARAN HISTOPATOLOGI JARINGAN KONJUNGTTIVA PADA TIKUS WISTAR MODEL KONJUNGTTIVITIS

Oleh

Alfina Indah Nabila

Latar Belakang: Kandungan metabolit sekunder pada daun kitolod memiliki aktivitas antimikroba, antiinflamasi, dan antioksidan yang secara *in vitro* terbukti dapat menghambat pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus*. Sejauh ini belum terdapat penelitian mengenai pengaruh pemberian daun kitolod secara *in vivo*.

Metode: Penelitian eksperimental dengan rancangan *post test only control design*. Penelitian dilakukan selama 15 hari menggunakan 25 ekor tikus yang terbagi ke dalam 5 kelompok, K- (akuades 2 tetes 4 kali sehari), K+ (kloramfenikol 0,5% 2 tetes 4 kali sehari), P1, P2, dan P3 (ekstrak daun kitolod dengan konsentrasi 37,5%; 75%; dan 150% diberikan sebanyak 2 tetes 4 kali sehari). Variabel dependen penelitian ini adalah gambaran histopatologi jaringan konjungtiva tikus.

Hasil: Jumlah sebulan neutrofil tertinggi terdapat pada kelompok P1 (410), diikuti oleh kelompok K-, P2, K+, dan P3 (343, 340, 263, dan 261). Uji *Kruskal-Wallis* didapatkan nilai $p=0,023$ ($p<0,05$). Uji *Post Hoc Mann-Whitney* menunjukkan adanya perbedaan bermakna antara K+ dengan P1, P1 dengan P2, dan P1 dengan P3 ($p<0,05$).

Simpulan: Terdapat pengaruh pemberian ekstrak daun kitolod terhadap gambaran histopatologi jaringan konjungtiva tikus Wistar model konjungtivitis.

Kata Kunci: Daun kitolod, konjungtivitis, neutrofil, *Staphylococcus aureus*

DAFTAR ISI

	Halaman
DAFTAR ISI	i
DAFTAR TABEL	iii
DAFTAR GAMBAR	iv
DAFTAR ISTILAH	v

BAB I PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang	1
1.2 Perumusan Masalah	3
1.3 Tujuan Penelitian.....	3
1.4 Manfaat Penelitian.....	4

BAB II TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Konjungtiva.....	5
2.1.1 Anatomi Konjungtiva	5
2.1.2 Fisiologi Konjungtiva.....	6
2.1.3 Histologi Konjungtiva	7
2.2 Konjungtivitis.....	8
2.3 Bakteri <i>Staphylococcus aureus</i>	8
2.4 Farmakoterapi Konjungtivitis	10
2.5 Tanaman Kitolod	10
2.5.1 Taksonomi dan Morfologi Tanaman Kitolod	11
2.5.2 Kandungan Daun Kitolod	12
2.6 Tikus Wistar	15

2.7 Kerangka Teori.....	16
2.8 Kerangka Konsep	17
2.9 Hipotesis	17
 BAB III METODE PENELITIAN	
3.1 Desain Penelitian	18
3.2 Tempat dan Waktu Penelitian	18
3.3 Populasi dan Sampel.....	19
3.4 Identifikasi Variabel	22
3.5 Definisi Operasional	23
3.6 Alat dan Bahan Penelitian.....	24
3.7 Prosedur Penelitian.....	24
3.8 Analisis Data	32
3.9 Alur Penelitian	33
3.10 Etika Penelitian	34
 BAB IV HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN	
4.1 Hasil Penelitian.....	35
4.2 Analisis Data	41
4.3 Pembahasan.....	43
4.4 Keterbatasan Penelitian	48
 BAB V KESIMPULAN DAN SARAN	
5.1 Simpulan	49
5.2 Saran	49
 DAFTAR PUSTAKA	50
LAMPIRAN	54

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Definisi Operasional.....	23
2. Hasil Uji Fitokimia Ekstrak Daun Kitolod.....	35
3. Hasil Jumlah Sebukan Neutrofil Tiap Kelompok Penelitian.....	39
4. Rerata Jumla Sebukan Neutrofil	41
5. Hasil Uji Normalitas Jumlah Sebukan Neutrofil	41
6. Hasil Uji Normalitas Data yang Sudah Ditransformasi	42
7. Hasil Uji <i>Kruskal-Wallis</i>	42
8. Hasil Uji <i>Post Hoc Mann-Whitney</i>	42

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Anatomi Konjungtiva.....	6
2. Histologi Jaringan Konjungtiva.....	7
3. Bakteri <i>Staphylococcus aureus</i>	9
4. Tanaman Kitolod	11
5. Tikus wistar	15
6. Kerangka Teori	16
7. Kerangka Konsep.....	17
8. Diagram Alur Penelitian.....	33
9. Pengamatan Gejala Tikus Wistar.....	35
10. Hasil Kultur Bakteri Swab Konjungtiva	36
11. Hasil Pengamatan Histologi Jaringan Konjungtiva Kelompok K	37
12. Hasil Pengamatan Histologi Jaringan Konjungtiva Kelompok K+	38
13. Hasil Pengamatan Histologi Jaringan Konjungtiva Kelompok P1	38
14. Hasil Pengamatan Histologi Jaringan Konjungtiva Kelompok P2	39
15. Hasil Pengamatan Histologi Jaringan Konjungtiva Kelompok P3	39

DAFTAR ISTILAH

1. β -KAS III : *β -Ketoacyl Acyl carrier protein Synthase III*
2. COX-2 :*cyclo-oxygenase 2*
3. CFU :*Colony Forming Units*
4. Fab :*Fragment antibodies*
5. Fc :*Fragment crystallizable*
6. G-CSF :*Granulocyte Colony-stimulating Factors*
7. IgG :*Imunoglobulin G*
8. IL-1 β :*Interleukin 1 β*
9. MSA :*Mannitol Salt Agar*
10. MSCRAMMS :*Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules*
11. NB :*Nutrient Broth*
12. NET :*Neutrophil Extracellular Traps*
13. PAMPs :*Pathogenassociated Molecular Patterns*
14. PRR :*Pattern Recognition Receptors*
15. TLR :*Toll-like Receptor*
16. TNF :*Tumor Necrosis Factor*

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Konjungtivitis adalah radang atau inflamasi yang terjadi pada konjungtiva merupakan penyakit mata yang sering terjadi di seluruh belahan dunia (Eva dan Augsburg, 2018). Konjungtivitis dapat disebabkan oleh alergi, virus, dan bakteri. Pada konjungtivitis bakterial paling sering diakibatkan oleh *Staphylococcus aureus* yang biasanya menyerang orang dewasa sampai lansia (Ryder dan Benson, 2020). Konjungtivitis juga dapat disebabkan oleh *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* dan *Moraxella catarrhalis* yang sering menyerang anak-anak (Hutnik *et al*, 2010).

Kejadian konjungtivitis bakteri di Amerika Serikat pada sebuah studi tahun 2010 diperkirakan terdapat 135 kasus per 10.000 orang (Hutnik *et al*, 2010). Pada tahun 2017 sebuah penelitian yang dilakukan pada 3.000 anak yang mengalami konjungtivitis akut didapatkan data sebanyak 10% diantaranya merupakan konjungtivitis bakteri (Pippin dan Le, 2020). Konjungtivitis, pada tahun 2009, menduduki urutan ke sepuluh penyakit terbanyak pada pasien rawat jalan di rumah sakit di Indonesia yaitu sebanyak 99.195 total kasus dengan sebanyak 46.380 kasus pada laki-laki dan 52.815 kasus pada perempuan (Kemenkes RI, 2018).

Umumnya penggunaan antibiotik untuk pengobatan konjungtivitis diberikan sebelum dilakukan uji jenis bakteri atau diberikan secara empiris. Pemberian antibiotik bertujuan untuk mengurangi gejala klinis dan rasa tidak nyaman pada mata. Akan tetapi, terdapat beberapa penelitian yang melaporkan terjadinya

kasus resistensi antibiotik. Penelitian yang dilakukan oleh Alter *et al* pada tahun 2019 melaporkan bahwa sebagian besar *staphylococci* menunjukkan resistensi terhadap oksasilin, ciprofloksasin, tobramisin dan azitromisin. Oleh karena itu banyak penelitian yang memanfaatkan kandungan senyawa kimia dari ekstrak tumbuhan yang dipercaya memiliki aktivitas antimikroba sebagai alternatif dari obat antibiotik. Salah satu tanaman yang memiliki aktivitas antimikroba adalah tanaman kitolod.

Kandungan metabolit sekunder pada daun kitolod seperti flavonoid, tannin, saponin, steroid, dan alkaloid memiliki aktivitas antioksidan, anti-inflamasi, dan antibakteri (Zarta *et al*, 2018). Kandungan flavonoid pada daun kitolod memiliki efek antiinflamasi yang bekerja dengan cara menghambat kerja dari enzim COX-2 (*cyclo-oxygenase 2*). Flavonoid juga memiliki efek inhibisi poten terhadap β -Ketoacyl acyl carrier protein synthase III (β -KAS III) *Staphylococcus aureus*, yang berfungsi menginisiasi sintesis asam lemak pada bakteri (Panche, Diwan dan Chandra, 2016). Flavonoid mengandung dua substansi, α -mangostin dan isobavachalcone, yang memiliki aktivitas bakterisida yang cepat terhadap bakteri gram positif serta dapat mengembalikan kerentanan kolistin terhadap patogen gram negatif (Song *et al*, 2021).

Beberapa penelitian yang dilakukan secara *in vitro* mengenai efek ekstrak daun kitolod terbukti dapat menghambat pertumbuhan bakteri *S. aureus*. Penelitian yang dilakukan oleh Simanjuntak pada tahun 2020 menunjukkan bahwa pada konsentrasi 12,5% ekstrak daun kitolod dapat menghambat pertumbuhan bakteri *S. aureus* dengan diameter zona hambat sebesar 7,06 mm yang termasuk ke dalam daya hambat sedang dan pada konsentrasi tertinggi yang diujikan, yaitu 75%, dapat menghambat pertumbuhan bakteri *S. aureus* dengan diameter zona hambat sebesar 11,3 mm yang termasuk ke dalam daya hambat kuat. Penelitian yang dilakukan oleh Simanjuntak sejalan dengan penelitian yang dilakukan oleh Nisa pada tahun 2019 yang menunjukkan bahwa pada konsentrasi 300 mg/ml mampu menghambat pertumbuhan bakteri *S. aureus*

dengan diameter zona hambat sebesar 14,3 mm yang termasuk ke dalam daya hambat kuat.

Berdasarkan kandungan ekstrak daun kitolod yang memiliki aktivitas anti bakteri di atas, penelitian ini bertujuan untuk mencari tahu pengaruh pemberian ekstrak daun kitolod terhadap gambaran histopatologi jaringan konjungtiva pada tikus wistar model konjungtivitis.

1.2 Perumusan Masalah

Berdasarkan uraian pada latar belakang di atas, didapatkan rumusan masalah sebagai berikut:

1. Apakah terdapat pengaruh pemberian ekstrak daun kitolod terhadap gambaran histopatologi jaringan konjungtiva pada tikus wistar model konjungtivitis?
2. Berapa kadar konsentrasi ekstrak yang memiliki efek paling berpengaruh terhadap gambaran histopatologi jaringan konjungtiva pada tikus wistar model konjungtivitis?

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan Umum

Tujuan umum dari penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh pemberian ekstrak daun kitolod terhadap gambaran histopatologi jaringan konjungtiva pada tikus wistar model konjungtivitis.

1.3.2 Tujuan Khusus

Tujuan khusus dari penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Mengetahui gambaran histopatologi jaringan konjungtiva tikus wistar yang telah diinduksi dengan bakteri *Staphylococcus aureus*.
2. Mengetahui gambaran histopatologi jaringan konjungtiva setelah diberi ekstrak daun kitolod pada tikus wistar yang telah diinduksi dengan bakteri *Staphylococcus aureus*.

3. Mengetahui konsentrasi mana yang memiliki efek paling berpengaruh terhadap gambaran histopatologi jaringan konjungtiva pada tikus wistar model konjungtivitis.

1.4 Manfaat Penelitian

1.4.1 Bagi Masyarakat

Memberikan pengetahuan terhadap penggunaan ekstrak daun kitolod terhadap penyembuhan konjungtivitis bakteri.

1.4.2 Bagi Institusi

Sebagai bahan kepustakaan bagi Fakultas Kedokteran Universitas Lampung.

1.4.3 Bagi Peneliti Lain

Dapat menjadi landasan penelitian untuk meneliti manfaat ekstrak daun kitolod lebih lanjut.

1.4.4 Bagi Peneliti

Menambah pengetahuan mengenai manfaat ekstrak daun kitolod terhadap jumlah sel radang jaringan konjungtiva pada tikus Wistar yang mengalami konjungtivitis akibat *Staphylococcus aureus*.

BAB II

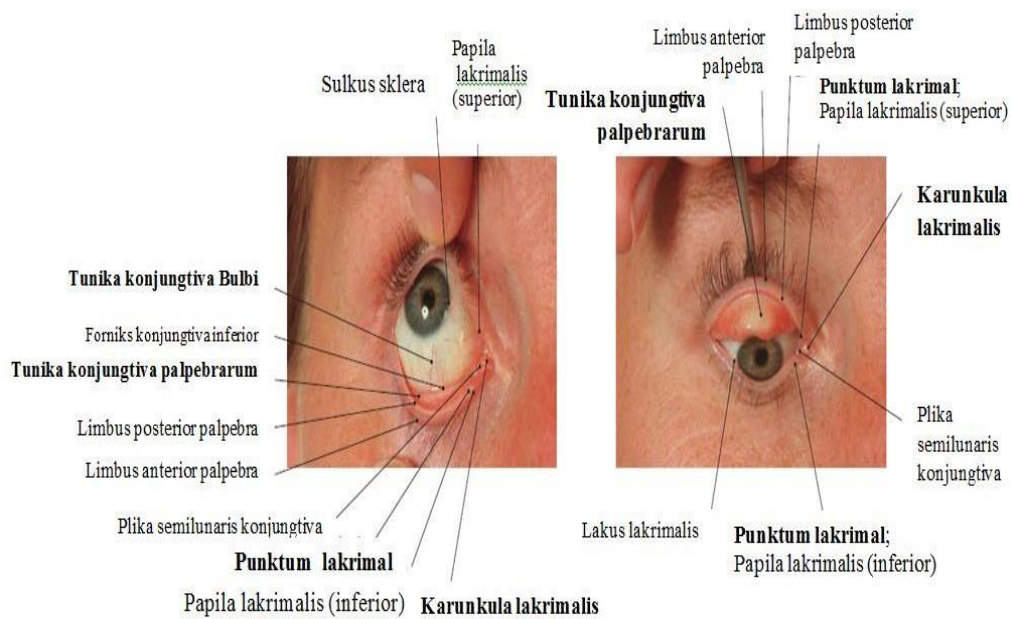
TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Konjungtiva

2.1.1 Anatomi Konjungtiva

Konjungtiva adalah membran tipis translusen mukosa dengan ketebalan kurang lebih 33 mikron dan terdapat struktur pembuluh darah. Konjungtiva berfungsi melapisi bagian dalam mata yang membentuk permukaan mata. Konjungtiva dapat dibedakan menjadi tiga region, yaitu:

1. Konjungtiva palpebral atau tarsal merupakan membran tipis translusen yang melapisi bagian dalam dari palpebral dan membentuk lapisan mukosa. Konjungtiva palpebral dapat dibagi lebih lanjut lagi menjadi pars marginal, tarsal, dan orbital.
2. Konjungtiva bulbi atau okular merupakan membran tipis translusen yang melapisi bola mata dan dapat dibagi menjadi pars skleral dan lumbal.
3. Konjungtiva forniks merupakan tempat menyatunya konjungtiva palpebral dan konjungtiva bulbi. Konjungtiva forniks dapat dibagi menjadi pars superior, inferior, medial, dan lateral. Konjungtiva forniks pars inferior akan membentuk kantung konjungtiva yang merupakan tempat pengaplikasian obat topikal mata (Paulsen dan Waschke, 2019; Shumway *et al*, 2021).



Gambar 1. Anatomi konjungtiva (Paulsen dan Waschke, 2019)

2.1.2 Fisiologi Konjungtiva

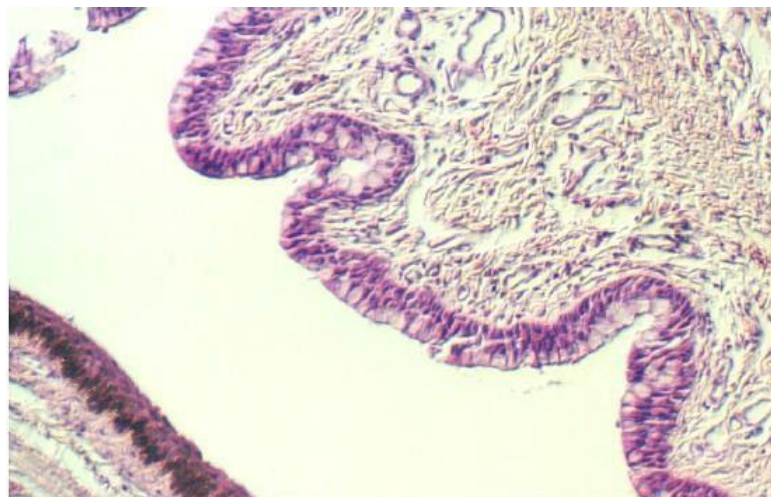
Indra penglihatan adalah salah satu hal yang penting untuk menyampaikan informasi ke otak. Mata sebagai organ penglihatan terletak pada cavum orbita yang dilindungi oleh tulang-tulang disekitarnya yang didukung juga oleh jaringan ikat dan jaringan lemak. Bagian anterior mata mengalami kontak langsung dengan lingkungan yang rentan terpapar benda asing seperti debu. Palpebral membantu melindungi mata dari benda asing dengan cara berkedip. Berkedip berfungsi untuk menyebarkan air mata dan mukus ke permukaan mata anterior supaya kelembapannya terjaga. Normalnya mata berkedip sebanyak 20 – 30 kali per menit (Gunstream, 2012).

Lapisan palpebral bagian dalam dilapisi oleh membran mukus, konjungtiva, yang berlanjut sampai permukaan anterior mata. Konjungtiva akan menyekresikan mukus yang membantu melumasi mata dan menjaga mata agar tetap lembap. Konjungtiva juga memiliki banyak pembuluh darah dan reseptor nyeri (Gunstream, 2013).

2.1.3 Histologi Konjungtiva

Konjungtiva merupakan membran mukosa tipis yang melapisi bagian anterior sklera dan berlanjut menjadi lapisan permukaan dalam palpebral. Konjungtiva dilapisi dengan epitel kolumnar berlapis dengan banyak sel-sel kecil yang menyerupai sel goblet dan ditunjang oleh selapis tipis lamina propria jaringan ikat longgar. Sel epitel konjungtiva dapat mensekresi mukus yang kemudian bersama air mata melapisi epitel konjungtiva sendiri dan kornea (Mescher, 2012).

Pada konjungtiva bulbi sel goblet lebih banyak ditemukan di dekat forniks dan juga terdapat sel inflamasi yang tersebar di lamina propia. Terdapat *pseudogland henle* pada konjungtiva palpebral yang menginvasi lapisan epitel sehingga membentuk struktur tubular dan kistik. Lamina propria pada konjungtiva palpebral memiliki gambaran yang lebih uniformis dibanding konjungtiva bulbi, terdapat arteriol, vena, dan jaringan kapiler kompleks. Apabila terjadi infeksi akibat bakteri ataupun alergi, konjungtiva palpebral akan membentuk papilar (Jain D, 2021).



Gambar 2. Histologi jaringan konjungtiva (Jain D, 2021)

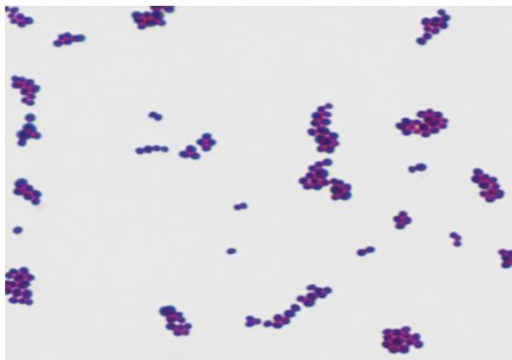
2.2 Konjungtivitis

Konjungtivitis adalah keadaan dimana konjungtiva mengalami inflamasi yang dapat disebabkan oleh banyak faktor (multifaktorial). Konjungtivitis dapat disebabkan oleh infeksi virus, bakteri, reaksi alergi, dan akibat pemakaian kontak lensa yang tidak diperhatikan kebersihannya sebagai penyebab tersering dan dapat disebabkan oleh jamur, parasit, bahan kimia atau zat iritan, dan lain-lain (Pippin dan Le, 2020).

Keparahan konjungtivitis bervariasi dapat berupa hiperemia ringan hingga konjungtivitis parah dengan adanya cairan purulen yang berlebihan (Eva dan Augsburg, 2018). Gejala penting yang dapat ditemukan antara lain adanya sensasi benda asing, sensasi ingin menggaruk dan terbakar, gangguan penglihatan, sekret purulen atau mukopurulen, lakrimasi dan fotofobia (Bhattacharyya *et al*, 2020). Gejala biasanya akan timbul 24 – 72 jam setelah terinfeksi bakteri (Azari dan Barney, 2015). Pada konjungtivitis akut gejala dapat terjadi selama 3 – 14 hari, sedangkan gejala konjungtivitis kronik dapat terjadi selama lebih dari 14 hari sampai lebih dari 4 minggu (Pippin dan Le, 2020).

2.3 Bakteri *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus adalah bakteri gram positif yang selnya berbentuk sferik atau bulat berdiameter sekitar 1 µm biasanya nonmotil dan tidak membentuk spora. *S. aureus* mampu memfermentasi karbohidrat, memproduksi asam laktat tapi tidak memproduksi gas dan memiliki kemampuan koagulase (Brooks *et al*, 2012).



Gambar 3. Bakteri *Staphylococcus aureus* (Brooks *et al*, 2012)

Staphylococcus mengandung polisakarida antigenik dan protein serta zat lain yang penting dalam struktur dinding selnya. Peptidoglikan, polimer polisakarida yang mengandung subunit terkait, membentuk kerangka luar yang kaku dari dinding sel. Peptidoglikan dihancurkan oleh asam kuat atau paparan lisozim. Ini penting dalam patogenesis infeksi yang memunculkan produksi IL-1 (pirogen endogen) dan antibodi opsonik oleh monosit, dan dapat menjadi *chemoattractant* untuk leukosit polimorfonuklear, memiliki aktivitas mirip endotoksin, dan mengaktifkan komplemen (Brooks *et al*, 2012).

Protein A adalah komponen dinding sel dari *S. aureus* dan merupakan protein permukaan bakteri yang telah dikarakterisasi di antara sekelompok adhesin yang disebut *microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules* (MSCRAMMS) atau komponen permukaan mikroba yang mengenali molekul matriks adhesif. Perlekatan bakteri ke sel inang dimediasi oleh MSCRAMMS, dan merupakan faktor virulensi yang penting. Protein A mengikat bagian Fc (*Fragment crystallizable*) dari molekul IgG (Imunoglobulin G) kecuali IgG3. Bagian Fab (*Fragment antibodies*) dari IgG yang terikat pada protein A bebas bergabung dengan antigen tertentu (Brooks *et al*, 2012).

Beberapa *S. aureus* memiliki kapsul yang dapat menghambat fagositosis oleh leukosit polimorfonuklear kecuali bila terdapat antibodi spesifik. Kebanyakan *S. aureus* memiliki koagulase, atau faktor penggumpalan, pada permukaan

dinding selnya. Koagulase mengikat secara nonenzimatis ke fibrinogen, yang kemudian akan menghasilkan agregasi bakteri (Brooks *et al*, 2012).

2.1 Patogenesis Konjungtivitis Bakteri Akibat *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus sebenarnya merupakan salah satu flora normal pada mata. Pada sebuah penelitian yang dilakukan pada tikus mengatakan bahwa tikus yang tidak memiliki flora normal akan lebih mudah terkena infeksi bakteri. Jaringan konjungtiva juga memiliki sel goblet yang berfungsi untuk melindungi dari infeksi dengan cara mengaktifkan caspase 1 pathway. Aktifnya caspase 1 pathway akan menginisiasi produksi IL-1 β (Interleukin 1 β) yang poten terhadap inflamasi. Adanya sel goblet inilah yang akan membuat konjungtiva sulit mengalami inflamasi, setidaknya harus $>10^5$ Colony Forming Units (CFU) dari *Staphylococcus aureus* untuk dapat menyebabkan infeksi (O'Callaghan, 2018).

2.4 Farmakoterapi Konjungtivitis

Konjungtivitis adalah infeksi pada jaringan konjungtiva mata yang dapat menyerang semua umur. Pengobatan konjungtivitis bakteri umumnya biasanya diberikan sebelum dilakukannya uji jenis bakteri, pengobatan dengan antibiotik topikal digunakan untuk mengurangi gejala klinis yang timbul dan rasa tidak nyaman (Alter *et al.*, 2019).

Gejala konjungtivitis bakteri biasanya sembuh dalam 3 – 5 hari setelah diberikan antibiotik. Penggunaan antibiotik topikal dengan spektrum luas dapat menjadi pilihan terapi konjungtivitis bakteri. Antibiotik spektrum luas yang umum digunakan pada kasus ringan-sedang konjungtivitis antara lain tobramisin, polimiksin B, antibiotik golongan florokuinolon, dan kloramfenikol. Dalam hal ini, kloramfenikol dapat menjadi antibiotik pilihan sebagai terapi konjungtivitis karena mudah ditemukan, harga yang lumayan terjangkau, dan efektif dalam menurunkan keluhan pada konjungtivitis. Kloramfenikol dalam bentuk sediaan obat tetes mata dengan konsentrasi 0,5%

dapat diberikan sebanyak dua tetes setiap enam jam pada gejala konjungtivitis ringan dan diberikan sebanyak satu tetes setiap dua jam selama 48 jam pada kasus yang lebih berat dan dilanjutkan menjadi dua tetes setiap enam jam bila gejala sudah berkurang orang (Hutnik *et al*, 2010; HSE, 2021).

2.5 Tanaman Kitolod

2.5.1 Taksonomi dan Morfologi Tanaman Kitolod

Taksonomi dari tanaman kitolod (*Hippobroma longiflora* (L.) G. Don) adalah sebagai berikut:

Kingdom	: Plantae
Subkingdom	: Viridiplantae
Superdivisi	: Embriofita
Divisi	: Trakeofita
Subdivisi	: Spermatofita
Kelas	: Magnoliopsida
Superordo	: Asteranae
Ordo	: Asterales
Filum	: Campanulaceae
Genus	: Hippobroma G. Don
Spesies	: Hippobroma longiflora (L.) G. Don

(ITIS Report, 2020)



Gambar 4. Tanaman Kitolod (Sari M, 2021)

Tanaman kitolod dapat dijumpai di dataran rendah sampai ketinggian 1.100 m dari permukaan laut. Kitolod berasal dari Hindia Barat dengan tinggi tanaman mencapai 60 cm. Taman kitolod biasanya tumbuh di tempat yang teduh dan lembab seperti di bawah semak-semak. Batang tanaman kitolod bercabang dari pangkalnya, memiliki getah berwarna putih yang rasanya tajam dan mengandung racun. Daun tanaman kitolod adalah daun tunggal berbentuk lanset dengan ujung daun yang runcing dan pangkal menyempit, serta memiliki tekstur permukaan daun yang kasar (Kelompok Masyarakat Desa Sirnasari, 2008; National Park, 2020).

Pada penelitian yang dilakukan oleh Simanjuntak pada tahun 2020, pengujian ekstrak daun kitolod terhadap isolat *S. aureus* terbukti dapat menghambat pertumbuhan isolat pada konsentrasi 12,5%, 25%, 50%, dan 75%. Konsentrasi ekstrak 12,5% dan 25% tergolong dalam daya hambat bakteri sedang, sedangkan konsentrasi ekstrak 50% dan 75% tergolong dalam daya hambat bakteri kuat. Peneliti berminat melanjutkan penelitian menggunakan ekstrak daun kitolod dengan konsentrasi 37,5%, 75%, dan 150%. Alasan peneliti memilih konsentrasi ekstrak daun kitolod 37,5%, 75%, dan 150% adalah karena pada mata obat tetes akan mengalami eliminasi oleh sawar darah mata yang menyebabkan bioavailabilitas obat berkurang sehingga digunakan konsentrasi ekstrak yang memiliki efektivitas paling baik dalam menghambat pertumbuhan bakteri, yaitu pada konsentrasi 75%. Konsentrasi yang digunakan sebagai pembanding didapatkan dari membagi dua konsentrasi efektif menjadi 37,5% dan menggali dua konsentrasi efektif menjadi 150%.

2.5.2 Kandungan Daun Kitolod

Ekstrak etanol pada daun kitolod mengandung senyawa metabolit sekunder berupa alkaloid, flavonoid, dan saponin. Kandungan metabolit sekunder pada tumbuhan kitolod memiliki aktivitas seperti antioksidan,

sitotoksik, antikanker, anti inflamasi, dan antimikroba (Simanjuntak, 2020).

2.5.2.1 Alkaloid

Alkaloid merupakan senyawa metabolit sekunder yang berasal dari asam amino. Alkaloid dibagi ke dalam beberapa subgrup berdasarkan asam amino yang membawa atom nitrogen dan penyusun kerangkanya. Alkaloid memiliki aktivitas menghambat enzim *dihydrofolate reductase* pada bakteri, yaitu suatu enzim yang penting dalam memproduksi prekursor purin dan pirimidin pada biosintesis asam amino, RNA, dan DNA, sehingga inhibisi dari enzim ini akan menghambat sintesis asam nukleat pada bakteri (Cushnie T *et al*, 2014; Othman *et al*, 2019).

2.5.2.2 Flavonoid

Flavonoid adalah senyawa metabolit sekunder tumbuhan yang memiliki struktur polifenol dan sering dijumpai pada buah-buahan serta sayuran. Flavonoid dibedakan ke dalam beberapa subgrup tergantung bentuk rantai karbon dan derajat rantai karbon yang tidak tersaturasi dan yang teroksidasi. Beberapa contoh subgrup flavonoid antara lain flavon, flavonol, flavanon, flavanonol, katekin, antosianin, dan calkon (Panche, Diwan and Chandra, 2016).

Flavonoid memiliki efek antiinflamasi yang bekerja dengan cara menghambat kerja dari enzim COX-2 (*cyclo-oxygenase 2*). Enzim COX-2 akan dihasilkan bila terdapat stimulus inflamasi dan berfungsi mensintesis prostaglandin yang akan menginduksi terjadinya inflamasi dan nyeri. Pada keadaan inflamasi, berbagai mediator endothelium dan faktor komplemen bisa menyebabkan adhesi dari leukosit di dinding endothelial yang akan

menghambat mobilisasi leukosit dan menstimulasi terjadinya degranulasi neutrophil. Hal ini akan memicu pelepasan oksidan dan mediator inflamasi sehingga dapat menyebabkan kerusakan jaringan. Flavonoid diketahui memiliki efek yang dapat menekan adhesi leukosit di dinding endothelial. Flavonoid juga memiliki efek inhibisi poten terhadap *β -Ketoacyl acyl carrier protein synthase III* (β -KAS III) *Staphylococcus aureus*, yang berfungsi menginisiasi sintesis asam lemak pada bakteri (Panche, Diwan and Chandra, 2016).

2.5.2.3 Saponin

Saponin adalah sebuah grup glikosida dengan berat molekul tinggi di mana rantai sakarida terhubung dengan triterpen atau steroid. Aktivitas antimikroba pada saponin memiliki tingkatan yang berbeda pada tiap tumbuhan. Secara umum saponin lebih poten terhadap bakteri gram positif dibandingkan dengan bakteri gram negatif (Patra, 2012).

2.5.2.4 Tannin

Aktivitas antibakteri pada tannin berkaitan dengan kemampuannya untuk melewati dinding bakteri menuju membran internal, sehingga dapat mengganggu metabolisme sel dan akhirnya dapat menyebabkan kerusakan sel bakteri. Aktivitas antibakteri tannin dapat bekerja cepat pada bakteri gram positif dibandingkan bakteri gram negatif, efek antibakteri akan lebih lambat karena lapisan membran bilayer pada bakteri gram negatif (Kaczmarek, 2020).

Pada penelitian yang dilakukan oleh Simanjuntak tahun 2020 yang meneliti efek kandungan fitokimia ekstrak daun kitolod terhadap *Staphylococcus aureus*, didapatkan hasil bahwa kandungan fitokimia

dari ekstrak daun kitolod terbukti dapat menghambat pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus*.

2.6 Tikus Wistar

Penggunaan model hewan coba sangatlah berperan penting dalam sebuah penelitian untuk membantu memahami fungsi gen, etiologi dan mekanisme penyakit, dan efektivitas serta toksisitas obat-obatan atau bahan-bahan kimia. Tikus (*Rattus norvegicus*) galur Wistar adalah model hewan yang paling sering digunakan bersama dengan galur *Sprague-Dawley*. Tikus memiliki ukuran yang lebih besar dibandingkan mencit, umumnya lebih agresif, dan lebih tahan terhadap berbagai penyakit (Johnson M, 2012).

Tikus wistar termasuk kedalam kelompok hewan pengerat atau rodensia dan merupakan hewan mamalia. Taksonomi tikus wistar lebih lanjut adalah sebagai berikut:

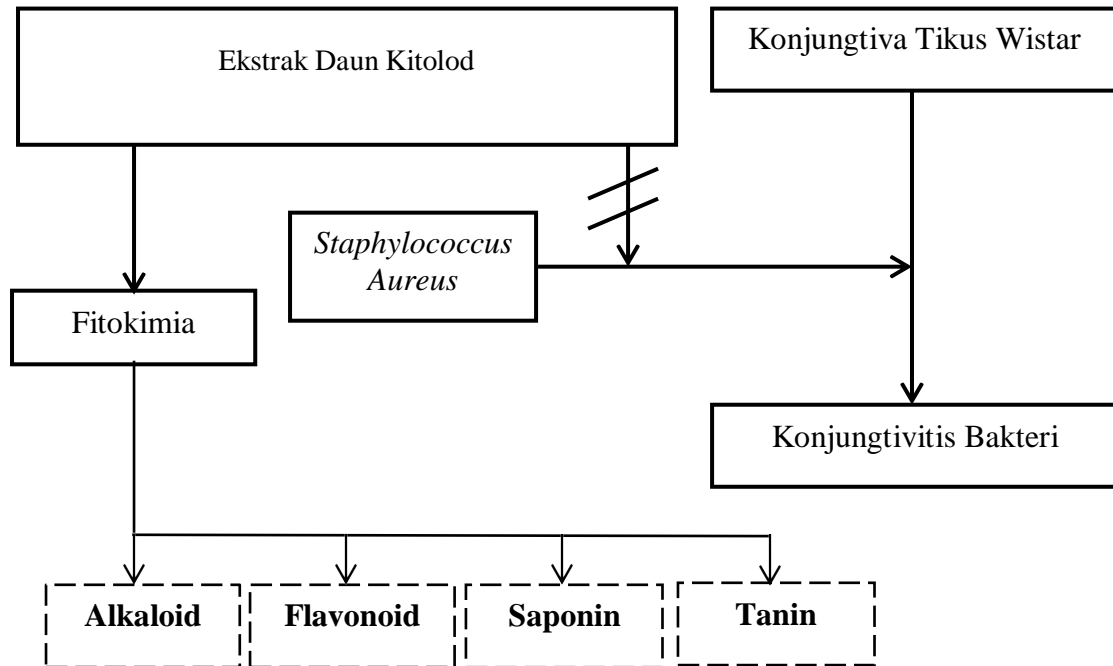
Kingdom : Animalia
Filum : Kordata
Kelas : Mammalia
Ordo : Rodentia
Famili : Muridae
Subfamili : Murinae
Genus : Rattus
Spesies : Rattus norvegicus

(NCBI, 2020)

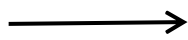


Gambar 5. Tikus wistar (Stephens J, 2001)

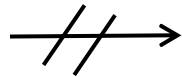
2.7 Kerangka Teori



Keterangan:



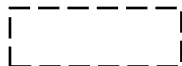
: Memengaruhi



: Menghambat



: Variabel yang diteliti

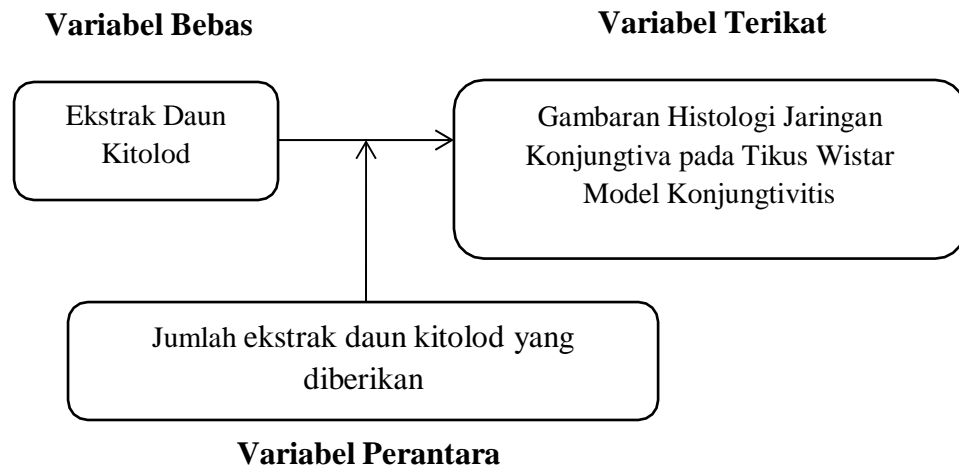


: Variabel diteliti secara kualitatif

Gambar 6. Kerangka Teori

(Pippin dan Le, 2020; Ryder dan Benson, 2020; Simanjuntak, 2020)

2.6 Kerangka Konsep



Gambar 7. Kerangka Konsep

2.7 Hipotesis

Hipotesis dari penelitian ini yaitu:

H0: Tidak terdapat pengaruh pemberian ekstrak daun kitolod terhadap gambaran histopatologi jaringan konjungtiva tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan galur wistar yang mengalami konjungtivitis.

H1: Terdapat pengaruh pemberian ekstrak daun kitolod terhadap gambaran histopatologi jaringan konjungtiva tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan galur wistar yang mengalami konjungtivitis.

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Desain Penelitian

Penelitian ini adalah suatu uji eksperimental laboratorium dengan jenis penelitian true experimental dengan diberikan perlakuan menggunakan rancangan *Post test Only Control Design* yang menggunakan hewan percobaan sebagai objek penelitian.

3.2 Tempat dan Waktu Penelitian

3.2.1 Tempat Penelitian

- a. Proses ekstraksi daun kitolod dilakukan di Laboratorium Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Lampung.
- b. Pembuatan konsentrasi dan penyaringan larutan ekstrak daun kitolod dilakukan di Laboratorium Farmasi Fakultas Kedokteran Universitas Lampung.
- c. Pembuatan tetes mata *S. aureus* yang kemudian diteteskan kepada hewan coba dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Lampung.
- d. Pembuatan preparat histopatologi dilakukan di Laboratorium Patologi Anatomi Nadafri.
- e. Pengamatan hasil histopatologi berupa jaringan konjungtiva dilakukan di Laboratorium Histologi dan Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Lampung.

3.2.2 Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan September 2022 hingga Januari 2023.

3.3 Populasi dan Sampel

3.3.1 Populasi

Populasi pada penelitian ini adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan galur Wistar.

3.3.2 Sampel

Sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah tikus wistar sebanyak 30 ekor yang akan dibagi ke dalam lima kelompok. Hewan coba yang akan menjadi objek penelitian harus memenuhi kriteria inklusi, yaitu:

- Tikus wistar jantan
- Berusia 2 – 3 bulan
- Berat badan 200 – 300 gram
- Sehat
- Tidak terdapat kelainan pada mata tikus

Tikus akan keluar dari kelompok hewan coba dan diganti dengan tikus baru apabila memiliki kriteria eksklusi, yaitu:

- Tikus mengalami penurunan berat badan lebih dari 10% setelah aklimatisasi atau kira-kira setelah satu minggu
- Sakit selama diberi perlakuan ditandai dengan adanya kerontokan rambut tikus dan aktivitas yang kurang aktif
- Mati setelah dilakukan intervensi

Cara untuk menentukan besar sampel yakni menggunakan Rumus Frederer:

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

Keterangan:

- t: Jumlah perlakuan
- n: Jumlah sampel per kelompok perlakuan

Pada penelitian ini terdapat 5 perlakuan yang berbeda ($t = 5$), maka:

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

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

$$4n - 4 \geq 15$$

$$4n \geq 19$$

$$n \geq 4,75$$

$$n = 5$$

Berdasarkan Rumus Federer di atas, jumlah minimum sampel yang dibutuhkan pada penelitian ini adalah sebanyak 5 ekor tikus pada setiap perlakuan. Pada penelitian ini akan dilakukan 5 kelompok perlakuan yang berbeda, maka dibutuhkan sebanyak 25 ekor tikus.

Dalam rangka mengantisipasi terjadinya kehilangan unit penelitian maka dilakukan koreksi dengan rumus proporsi *drop out* sebagai berikut:

$$N = \frac{n}{(1 - f)}$$

Keterangan:

- N adalah Besar sampel koreksi.
- n adalah besar sampel awal.
- f adalah proporsi unit eksperimen yang hilang atau drop out sebesar 10 %

Berdasarkan penjabaran di atas, pada penelitian ini dibutuhkan 25 ekor tikus yang dibagi ke dalam lima kelompok kemudian tiap kelompok akan ditambah satu tikus sehingga besar sampel yang dibutuhkan adalah sebanyak 30 ekor tikus.

3.3.3 Kelompok Perlakuan

Kelompok dibagi menjadi 2 kelompok kontrol dan 3 kelompok perlakuan. Jumlah hewan coba tiap kelompok adalah 6 ekor tikus, sehingga total keseluruhan hewan coba yang digunakan adalah sebanyak 30 ekor tikus. Selanjutnya hewan coba dipilih secara acak dan dibagi ke dalam 5 kelompok, yaitu:

1. Kelompok Kontrol Negatif (K-): tikus diinduksi konjungtivitis menggunakan bakteri *S. aureus* selama 3 hari dan dilanjutkan dengan pemberian akuades 4 kali sehari sebanyak 2 tetes selama 5 hari.
2. Kelompok Kontrol Positif (K+): tikus diinduksi konjungtivitis menggunakan bakteri *S. aureus* selama 3 hari dan dilanjutkan dengan pemberian antibiotik kloramfenikol 0,5% 4 kali sehari sebanyak 2 tetes selama 5 hari.
3. Kelompok Perlakuan 1 (P1): tikus diinduksi konjungtivitis menggunakan bakteri *S. aureus* selama 3 hari dan dilanjutkan dengan pemberian ekstrak daun kitolod konsentrasi 37,5% 4 kali sehari sebanyak 2 tetes selama 5 hari.
4. Kelompok Perlakuan 2 (P2): tikus diinduksi konjungtivitis menggunakan bakteri *S. aureus* selama 3 hari dan dilanjutkan dengan pemberian ekstrak daun kitolod konsentrasi 75% 4 kali sehari sebanyak 2 tetes selama 5 hari.
5. Kelompok Perlakuan 3 (P3): tikus diinduksi konjungtivitis menggunakan bakteri *S. aureus* selama 3 hari dan dilanjutkan dengan pemberian ekstrak daun kitolod konsentrasi 150% 4 kali sehari sebanyak 2 tetes selama 5 hari.

3.4 Identifikasi Variabel

3.4.1 Variabel Independen

Variabel independen (bebas) pada penelitian ini adalah ekstrak daun kitolod.

3.4.2 Variabel Dependen

Variabel dependen (terikat) pada penelitian ini adalah gambaran histopatologi jaringan konjungtiva tikus yang mengalami konjungtivitis dan telah diberi ekstrak daun kitolod.

3.4.3 Variabel Perantara

Variabel perantara yang dapat dikendalikan adalah jumlah ekstrak daun kitolod yang diberikan.

3.5 Definisi Operasional

Tabel 1. Definisi Operasional

Variabel	Definisi	Alat Ukur	Hasil Ukur	Skala
Ekstrak Daun Kitolod	Daun kitolod dikeringkan dan dihaluskan hingga menjadi serbuk. Serbuk selanjutnya dimaserasi menggunakan etanol 96%. Kemudian serbuk disaring menggunakan kertas saring dan hasil filtrat dipekatkan dengan <i>rotary evaporator</i> di suhu 50°C hingga didapatkan hasil berupa filtrat pekat. Ekstrak pekat kitolod kemudian dilarutkan dalam DMSO 10% untuk mendapatkan 3 konsentrasi ekstrak, (37,5%; 75%; dan 150%) (Simanjuntak, 2020).	Neraca Analitik dan Gelas Ukur	<ul style="list-style-type: none"> • Kelompok perlakuan 1: ekstrak daun kitolod konsentrasi 37,5% • Kelompok perlakuan 2: ekstrak daun kitolod konsentrasi 75% • Kelompok perlakuan 3: ekstrak daun kitolod konsentrasi 150% (Simanjuntak, 2020) 	Ordinal
Gambaran Histopatologi Jaringan Konjungtiva	Jaringan konjungtiva yang mengalami konjungtivitis diberi pewarnaan <i>Hematoxylin & Eosin</i>	Miroskop Cahaya	Rerata jumlah neutrophil pada tiap preparat dengan mengamati pada 10 lapang pandang, yaitu 5 lapang pandang pada konjungtiva superior & 5 lapang pandang pada konjungtiva inferior. Tiap 5 lapang pandang dibagi menjadi 2 konjungtiva bulbi, 2 konjungtiva palpebral, dan 1 konjungtiva forniks (Awara <i>et al.</i> , 2020).	Rasio

3.6 Alat dan Bahan Penelitian

3.6.1 Alat Penelitian

Alat yang digunakan pada penelitian ini yaitu alat untuk pemeliharaan tikus (kandang tikus, penutup kandang, botol minum, dan wadah pakan tikus) , spet 1 cc, spet 5 cc, lampu bunsen, ose bulat, cawan petri, sarung tangan steril, jas laboratorium, label, kapas, *rotary evaporator*, mikroskop, botol steril, kertas saring, pipet tetes, kaca objek, kaca penutup, tabung reaksi, dan rak tabung reaksi.

3.6.2 Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan pada penelitian ini yaitu bakteri *S. aureus*, tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan galur wistar, alkohol 70%, daun kitolod, DMSO 10%, akuades, dan bahan pemeliharaan tikus berupa pelet standar, air minum, dan sekam.

3.7 Prosedur Penelitian

3.7.1 Pemilihan Hewan Coba

Jumlah hewan coba yang digunakan pada penelitian ini sebanyak 30 ekor tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan galur Wistar dibagi menjadi 5 kelompok yang dipilih secara random. Satu kelompok berisikan 5 ekor hewan coba dan 1 hewan coba cadangan.

3.7.2 Aklimatisasi Hewan Coba

Sebelum diberikan perlakuan, mula-mula hewan coba diaklimatisasi selama 7 hari bertujuan agar tikus dapat menyesuaikan lingkungan sekaligus memantau kesehatan, berat badan, makanan dan minuman dari hewan coba.

3.7.3 Pembuatan Ekstrak Daun Kitolod dan Pembuatan Konsentrasi

Daun kitolod dikeringkan terlebih dahulu selama kira-kira 3 hari kemudian dihaluskan hingga menjadi serbuk. Menggunakan metode maserasi untuk membuat ekstrak daun kitolod. Serbuk daun kitolod

sebanyak 500 gram dimasukkan ke dalam botol kemudian diberi etanol 96% sebanyak 2.000 ml dan tunggu sampai warna pelarut tidak mengalami perubahan. Langkah selanjutnya serbuk disaring menggunakan kertas saring dan hasil saringan filtrat dipekatkan dengan *rotary evaporator* pada suhu 50°C hingga didapatkan hasil akhir berupa filtrat pekat. Hasil akhir ekstrak pekat daun kitolod yang didapat adalah 14 gram. Ekstrak pekat daun kitolod kemudian dilarutkan dalam DMSO 10% untuk mendapatkan 3 konsentrasi ekstrak, yaitu 37,5%, 75%, dan 150% (Simanjuntak, 2020).

Banyaknya tetesan ekstrak daun kitolod yang akan diberikan menyesuaikan dengan antibiotik kloramfenikol. Kloramfenikol dalam bentuk sediaan obat tetes mata dengan konsentrasi 0,5% dapat diberikan sebanyak dua tetes setiap enam jam pada gejala konjungtivitis ringan (HSE, 2021). Maka dari itu, jumlah ekstrak daun kitolod yang akan diberikan pada hewan coba yaitu 2 tetes 4 kali sehari.

Pemberian perlakuan dilakukan selama 5 hari pada 30 ekor hewan coba. Tiap ekor tikus memerlukan 16 tetes larutan ekstrak daun kitolod untuk kedua mata. Satu kelompok perlakuan berisi 6 ekor tikus, maka untuk 1 kelompok memerlukan 96 tetes larutan ekstrak per hari. Oleh karena perlakuan dilakukan dalam 5 hari, maka jumlah tetesan yang dibutuhkan per kelompok adalah sebanyak 480 tetes dalam 5 hari perlakuan. Apabila diubah ke dalam ml maka 480 tetes sama dengan 24 ml, maka setiap konsentrasi larutan ekstrak daun kitolod (37,5%; 75%; dan 150%) yang dibutuhkan adalah sebanyak 24 ml. Untuk mendapatkan konsentrasi baru yang diinginkan diperlukan pengenceran dengan formula sebagai berikut.

$$C1 = \frac{V1}{V2} \times C2$$

Keterangan:

C1 = Konsentrasi sampel baru

C2 = Konsentrasi sampel yang diketahui

V1 = Volume sampel baru

V2 = Volume sampel yang telah diketahui

Setiap kelompok perlakuan memerlukan 24 ml larutan ekstrak daun kitolod maka:

a. Konsentrasi 37,5%

$$C1 = \frac{24}{100} \times 37,5$$

$$C1 = 9 \text{ gr}$$

Maka, untuk mendapatkan larutan dengan konsentrasi 37,5% adalah dengan melarutkan 9 gr ekstrak pekat daun kitolod ke dalam 24 ml DMSO 10%.

b. Konsentrasi 75%

$$C1 = \frac{24}{100} \times 75$$

$$C1 = 18 \text{ gr}$$

Maka, untuk mendapatkan larutan dengan konsentrasi 75% adalah dengan melarutkan 18 gr ekstrak pekat daun kitolod ke dalam 24 ml DMSO 10%.

c. Konsentrasi 150%

$$C1 = \frac{24}{100} \times 150$$

$$C1 = 36 \text{ gr}$$

Maka, untuk mendapatkan larutan dengan konsentrasi 150% adalah dengan melarutkan 36 gr ekstrak pekat daun kitolod ke dalam 24 ml DMSO 10%.

Ekstrak pekat yang telah dilarutkan dengan DMSO 10% hingga menjadi konsentrasi yang diinginkan kemudian disaring dengan kertas saring untuk memisahkan gumpalan ekstrak dengan larutan ekstrak agar larutan ekstrak menjadi isotonis.

Total ekstrak pekat yang dibutuhkan selama penelitian untuk membuat tiga konsentrasi yang berbeda adalah 63 gram. Apabila 500 gram serbuk daun kitolod menghasilkan 14 gram ekstrak pekat daun kitolod, maka untuk mendapatkan 63 gram ekstrak pekat dibutuhkan setidaknya 2.500 gram bubuk daun kitolod.

3.7.4 Kultur Bakteri dalam Media Cair

Bakteri *Staphylococcus aureus* yang berada pada media agar MSA dipindahkan ke media cair *Nutrient Broth* (NB) dengan cara panaskan ose bulat terlebih dahulu pada api bunsen. Ambil bakteri dengan ose bulat dan masukkan ke dalam tabung reaksi yang berisi media cair NB dan kocok supaya homogen. Selanjutnya pindahkan media cair ke dalam spet 5 cc (Yusmaniar, Wardiyah dan Nida, 2017).

3.7.5 Penetasan Bakteri pada Tikus

Setelah hewan coba diaklimatisasi selama 7 hari, pada hari ke 8 tikus mulai diinduksi konjungtivitis menggunakan *S. aureus* $1,5 \times 10^8$ CFU/ml kurang lebih 1 tetes tiap 10 menit selama 1 jam yang diteteskan ke kedua mata tikus. Tikus yang sudah diinduksi konjungtivitis dibiarkan selama 3 hari sampai mengalami konjungtivitis.

3.7.6 Swab Konjungtiva dan Kultur Bakteri

Swab konjungtiva dilakukan dilakukan pada hari ke sebelas setelah induksi konjungtivitis yang bertujuan untuk mengetahui apakah terdapat infeksi bakteri pada mata tikus coba. Swab konjungtiva menggunakan lidi kapas steril yang kemudian disimpan di *microtube* berisi akuades. Sampel swab konjungtiva kemudian dikultur dengan metode *pour plate* dengan media agar MSA (*Mannitol Salt Agar*).

3.7.7 Pemberian Ekstrak Daun Kitolod

Tikus dengan model konjungtivitis kemudian diberikan perlakuan sesuai kelompoknya yaitu masing-masing kelompok secara berurutan, 1 – 5, diberi akuades (kontrol negatif), kloramfeniol 0,5% (kontrol positif), dan ekstrak daun kitolod dengan konsentrasi 37,5%, 75%, dan 150%. Perlakuan dilakukan sebanyak 2 tetes 4 kali per hari dan dilakukan selama 5 hari pada pukul 07.00; 10.00; 13.00; dan 16.00 WIB sesuai jam operasional FK Unila.

3.7.7 Terminasi Hewan Coba

Prosedur euthanasia hewan coba dapat dilakukan dengan menyuntikan ketamine secara intraperitoneal atau intramuskular sebanyak 50 – 75 mg/KgBB tikus wistar (Badan POM Republik Indonesia, 2021).

3.7.8 Pembuatan Preparat Histopatologi

Setelah dilakukan euthanasia pada hewan coba kemudian dilakukan eksenterasi bola mata tikus dan difiksasi ke dalam cairan formalin 10%. Selanjutnya pembuatan preparat menggunakan pewarnaan *Hematoxylin & Eosin* (H&E) (Khristian dan Inderiati, 2017). Prosedur pembuatan preparat histopatologi lebih lanjut berdasarkan bagian PA FK Unila adalah:

a. *Fixation*

Bola mata tikus difiksasi dengan formalin 10% selama tiga jam. Hal ini bertujuan untuk meminimalisir kerusakan pada spesimen saat terlepas dari tubuh tikus.

b. *Trimming*

Organ dicuci dengan air mengalir sebanyak 3 – 5 kali, kemudian dimasukkan ke dalam *tissue cassette*.

c. Dehidrasi

Proses dehidrasi dilakukan dengan cara meletakkan *tissue cassette* pada tisu pengering, kemudian didehidrasi dengan:

1. Alkohol 70% selama 30 menit

2. Alkohol 96% selama 30 menit
3. Alkohol 96% selama 30 menit
4. Alkohol 96% selama 30 menit
5. Alkohol absolut selama 60 menit
6. Alkohol absolut selama 60 menit
7. Alkohol absolut selama 60 menit
8. Alkohol xylol 1:1 selama 30 menit

d. *Clearing*

Alkohol yang masih tersisa pada spesimen dibersihkan menggunakan xylol I dan xylol II masing-masing dilakukan selama satu jam.

e. *Impregnasi*

Impregnasi bertujuan untuk mematangkan jaringan menggunakan paraffin I dan paraffin II masing-masing dilakukan selama satu jam di dalam oven dan atur suhu pada 60°C.

f. *Embedding*

1. Sisa paraffin yang ada pada *pan* dibersihkan dengan dipanaskan di atas api dan diusap dengan kapas.
2. Paraffin cair disiapkan dengan memasukkan paraffin ke dalam cangkir logam dan dimasukkan ke dalam oven dengan suhu di atas 58°C.
3. Paraffin cair dituangkan ke dalam *pan*.
4. Organ dipindahkan satu per satu dari tissue cassette ke dasar *pan* dan diatur jaraknya antara satu dengan yang lain.
5. *Pan* dimasukkan ke dalam air.
6. Paraffin yang berisi potongan organ dilepaskan dari *pan* dengan cara dimasukkan ke dalam suhu 4–6°C beberapa saat.
7. Paraffin dipotong sesuai dengan letak jaringan yang ada menggunakan skalpel.
8. Selanjutnya diletakkan pada balok kayu, diratakan pinggirnya dan ujungnya dibuat sedikit meruncing.

g. *Cutting*

Pemotongan dilakukan dengan menggunakan *disposable knife*. Lembaran potongan terbaik kemudian diapungkan pada air untuk menghilangkan kerutan pada spesimen dengan cara menekan salah satu sisi lembaran spesimen sembari menarik sisi lainnya menggunakan kuas runcing. Lembaran spesimen diambil dengan *slide* bersih dan hindari adanya gelembung di bawah jaringan. Terakhir letakkan spesimen pada inkubator selama 24 jam dengan suhu 37°C yang bertujuan untuk mengeringkan *slide*.

h. Pewarnaan Spesimen

Pewarnaan spesimen menggunakan zat warna *Hematoxylin & Eosin* (H&E) setelah dipastikan bahwa jaringan melekat sempurna pada *slide*. Prosedur pewarnaan spesimen adalah sebagai berikut:

1. Deparafinisasi, spesimen masih mengandung paraffin sehingga harus dibilas terlebih dahulu dengan larutan xylol I dan xylol II masing-masing dilakukan selama 5 menit.
2. Lakukan hidrasi dengan memberikan alkohol 96% dan alkohol 70% masing-masing selama 2 menit, kemudian bilas dengan air selama 10 menit.
3. Lakukan pewarnaan spesimen dimulai dengan *Hematoxylin* selama 15 menit dan bilas dengan air mengalir.
4. Pewarnaan selanjutnya menggunakan zat warna *Eosin* selama 1 menit.
5. Lakukan dehidrasi dengan alkohol 70%, alkohol 96%, dan alkohol absolut secara bergantian masing-masing selama 2 menit.
6. Lakukan penjernihan dengan xylol I dan xylol II masing-masing selama 2 menit.

i. *Mounting*

Setelah dilakukan pewarnaan, *slide* diletakkan di atas tisu pada tempat dengan permukaan yang datar, ditetesi dengan bahan

mounting yakni entelan, dan ditutup dengan *cover glass*. Lakukan dengan hati-hati jangan sampai terbentuk gelembung udara.

j. Pembacaan slide dengan bantuan mikroskop cahaya.

3.7.9 Pengamatan Gambaran Histopatologi Jaringan Konjungtiva

Pengamatan gambaran histopatologi jaringan konjungtiva dilakukan setelah hari terakhir perlakuan atau setelah hari ke-5. Pengamatan bertujuan untuk mengetahui gambaran konjungtiva setelah diberikan perlakuan dengan cara menghitung rerata jumlah neutrophil pada tiap preparat dengan mengamati pada 10 lapang pandang, yaitu 5 lapang pandang pada konjungtiva superior dan 5 lapang pandang pada konjungtiva inferior. Tiap 5 lapang pandang dibagi menjadi 2 konjungtiva bulbi, 2 konjungtiva palpebral, dan 1 konjungtiva forniks dengan bantuan mikroskop cahaya perbesaran 40 kali (Awara *et al*, 2020).

3.7.10 Pembuangan Bangkai Hewan Coba

Pembuangan bangkai hewan coba penting dilakukan untuk menghindari pencemaran lingkungan dan juga menghindari kontaminasi mikroorganisme pada manusia ataupun hewan hidup lainnya. Penanganan bangkai harus dilakukan dengan aman sehingga perlu menggunakan alat pelindung diri seperti sarung tangan, sepatu bot, dan masker. Terdapat beberapa cara untuk memusnahkan bangkai hewan coba antara lain pengomposan, pembakaran, dan penguburan (Shafiqur *et al.*, 2017).

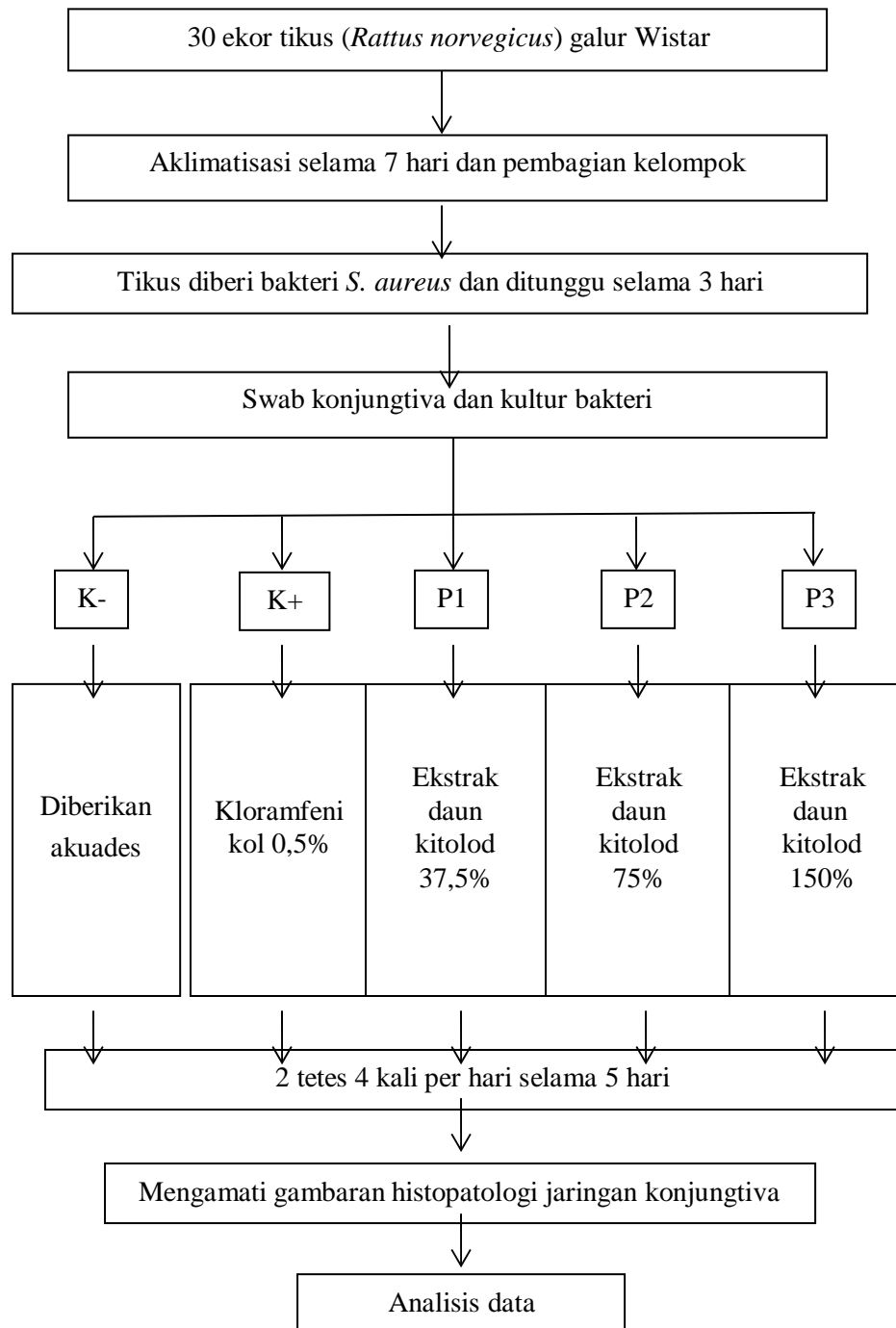
Penguburan adalah teknik yang umum digunakan untuk memusnahkan bangkai hewan coba. Lokasi yang tepat untuk penguburan adalah tempat yang jauh dari aktivitas manusia, berjarak 200 meter dari sumber air, berjarak 300 meter dari bangunan, jauh dari infrastruktur seperti kabel listrik ataupun pipa air, dan dikubur di tanah yang padat

dengan stabilitas yang baik. Kedalaman tanah galian disarankan sedalam lima meter dengan tiga meter sebagai tempat bangkai dikubur dan dua meter bagian atas untuk diisi tanah penutup lubang galian dengan lebar tidak lebih dari tiga meter dan panjang lubang disesuaikan dengan jumlah bangkai hewan coba yang hendak dikubur (NSW, 2013; Badan POM Republik Indonesia, 2021).

3.8 Analisis Data

Data penelitian dianalisis menggunakan uji statistik yang dibantu dengan *software* program statistik. Pengujian pertama adalah uji normalitas menggunakan uji *Shapiro Wilk* karena jumlah sampel yang digunakan pada penelitian ini <50 kemudian dilanjutkan uji *Levene's test* untuk mengetahui homogenitas data. Hasil dikatakan normal dan homogen bila $p > 0,05$. Oleh karena pada penelitian ini data tidak terdistribusi normal, maka setelah uji normalitas dilanjutkan dengan uji non-parametrik *Kruskal-Wallis* dengan uji perbandingan tiap kelompok menggunakan uji *Mann-Whitney*.

3.9 Alur penelitian



Gambar 8. Diagram Alur Penelitian

3.10 Etika Penelitian

Penelitian ini sudah mendapatkan persetujuan etik dari Komite Etik Kesehatan Fakultas Kedokteran Universitas Lampung dengan nomor surat 26013/UN26.18/PP.05.02.00/2022.

BAB V

SIMPULAN DAN SARAN

5.1 Simpulan

Pemberian ekstrak daun kitolod dengan konsentrasi 37,5%; 75%; dan 150% dapat memberikan pengaruh terhadap gambaran histopatologi jaringan konjungtiva pada tikus Wistar model konjungtivitis walaupun secara statistik tidak memiliki perbedaan yang signifikan. Peningkatan konsentrasi ekstrak daun kitolod berbanding lurus dengan efek antibakteri yang diberikan.

5.2 Saran

Saran pada penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Kepada peneliti lain untuk melakukan penelitian lebih lanjut tentang pengaruh penggunaan bahan aktif yang terdapat pada daun kitolod.
2. Kepada peneliti lain untuk melakukan penelitian lebih lanjut dengan interval waktu pemberian perlakuan setiap enam jam.

DAFTAR PUSTAKA

- Alter SJ, *et al.* 2019. Antibiotic resistance among pediatric-sourced ocular pathogens: 8-year findings from the antibiotic resistance monitoring in ocular microorganisms (armor) surveillance study. *Pediatric Infectious Disease Journal*. 38(2):138–145.
- Astley R, Miller FC, Mursalin MH, Coburn PS, Callegan MC. 2019. An eye on *Staphylococcus aureus* toxins: roles in ocular damage and inflammation. *MDPI*. 356(11):1 - 7
- Awara A, *et al.* 2020. Effectiveness of subconjunctival cyclosporine in treatment of acute allergic conjunctivitis in a rat-model. *Clinical Ophthalmology*. 14:431–435.
- Awwad S, *et al.* 2017. Principles of pharmacology in the eye. *British Journal of Pharmacology*. 174(23): 4205–4223.
- Azari AA dan Barney NP. 2015. Conjunctivitis. *Clinical Infectious Disease*. 310(16):81–87.
- Badan POM Republik Indonesia. 2021. Pedoman Uji Farmakodinamik Praktikum Obat Tradisional. BPOM RI. (1): 20-21.
- Bhattacharyya A, *et al.* 2020. Bacteriological pattern and their correlation with complications in culture positive cases of acute bacterial conjunctivitis in a tertiary care hospital of upper Assam: A cross sectional study. *Medicine*. 99(7):1–10.
- Brooks GF, Jawetz E, Melnick JL. 2012. Mikrobiologi Kedokteran Jawetz, Melnick, & Adelberg. Edisi 25. Jakarta: EGC.
- Chen H, *et al.* 2022. Exploring the role of *Staphylococcus aureus* in inflammatory diseases. *MDPI*. 464(14):1 - 15
- Cushnie T, Cushnie B, Lamb A. 2014. Alkaloids: An overview of their antibacterial, antibiotic-enhancing and antivirulence activities. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 44(5):377–386.
- Cushnie T, Lamb A. 2005. Antimicrobial activity of flavonoids', *International Journal of Antimicrobial Agents*. 26(5):343–356.
- Eva RP, Augsburger JJ. 2018. Vaughan & Asbury's General Ophthalmology. Edisi

19. New York: McGraw-Hill Education, Inc.

Gunstream, S.E., 2013. *Anatomy and Physiology with Integrated Study Guide*. Edisi 5. New York: Mc Graw Hill.

Hutnik C, Mohammad H, Mohammad-Shahi M. 2010. Bacterial conjunctivitis. *Clinical Ophthalmology*. 4(1):1451–1457.

Itis.gov. 2020. ITIS - Report: Hippobroma longiflora. [Online Journal] [Diakses 7 Desember 2020]. Tersedia dari:
https://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=34578#null.

Jain D. 2021. Anatomy & histology-conjunctiva. Pathologyoutlines.com. [Online Journal] [Diakses 18 September 2021]. Tersedia dari:
<https://www.pathologyoutlines.com/topic/eyeconjunctivahistology.html>.

Johnson M. 2012. Labome: Laboratory Mice and Rats. [Online Journal] [Diakses 19 Desember 2020]. Tersedia dari:
<http://www.labome.com/method/LaboratoryMice-and-Rats.html>.

Kaczmarek B. 2020. Tannic acid with antiviral and antibacterial activity as a promising component of biomaterials-A minireview. *Materials*. 13(14):1–13.

Kelompok Masyarakat Desa Sirnasari. 2008. *Tumbuhan Obat Halimun*. Suka bumi Jawa Barat: Yayasan Peduli Konservasi Alam Indonesia.

Kementrian Kesehatan RI. 2018. Profil Kesehatan Indonesia Tahun 2009. Jakarta: Kemenkes RI.

Khan MI, et al. 2018. Green tea seed isolated saponins exerts antibacterial effects against various strains of gram positive and gram negative bacteria, a comprehensive study in vitro and in vivo. *Hindawi*. 1 -3

Khristian E, Inderiati D. 2017. *Bahan Ajar: Teknologi Laboratorium Medis (TLM)*. Jakarta: Kemenkes RI.

Kobayashi SD, Malachowa N, DeLeo R. 2018. Neutrophils and bacterial immune evasion. *Innate Immunity*. 1 - 9

Livingston ET, Mursalin MH, Callegan MC. 2019. A pyrrhic victory: the PMN response to ocular bacterial infections. *MDPI*. 537(7):1 - 4.

Mescher AL. 2012. *Histologi Dasar Junqueira: Teks dan Atlas*. Edisi 12. Jakarta: EGC.

National Parks. 2020. Hippobroma longiflora (L.) G.Don. Flora Fauna Web. [Online Journal] [diakses 24 September 2021]. Tersedia dari:
<https://www.nparks.gov.sg/florafaunaweb/flora/2/1/2188>.

NCBI. 2012. Rats, Wistar Classification. [Diakses 17 Desember 2020]. Tersedia

dari: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh/68017208>.

- Nisa, TC. 2019. Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Daun Kitolod (*Isotoma longiflora* L.) C, PREST Terhadap Bakteri *Staphylococcus aureus* Dengan Kontrol Antibiotik Ofloxacin. *Farmasindo*. 3(1):51.
- NSW. 2013. Animal Carcass Disposal Pathway. *Primefact*. 2: 1–6. Available at: <http://www-ehs.ucsd.edu/animal/AnimalCarcassDisposal.pdf>.
- Nunes CDR, Barreto AM, Menezes FPS, Leandro CL, Souza PM, Pereira ML, Vieira IJC, Barros OD. 2020. Plants as Sources of Anti-Inflammatory Agents. *Molecules*. 25(16):3726.
- O’Callaghan RJ. 2018. The pathogenesis of staphylococcus aureus eye infections. *Pathogens*. 7(1):1–22.
- Othman L, Sleiman A, Abdel-massih RM. 2019. Antimicrobial Activity of Polyphenols and Alkaloids in Middle Eastern Plants. *Frontiers in Microbiology*. 10:1–28.
- Panche AN, Diwan AD, Chandra SR. 2016. Flavonoids: An overview. *Journal of Nutritional Science*. 5: 1–15.
- Patel SS dan Savjani JK. 2015. Systematic review of plant steroids as potential antiinflammatory agents: Current status and future perspectives. *The Journal of Phytopharmacology*. 4(2): 121-125.
- Patra AK. 2012. An Overview of Antimicrobial Properties of Different Classes of Phytochemicals. *Dietary Phytochemicals and Microbes*. 1:1–32. Paulsen HVF, Waschke J. 2019. Sobotta: Atlas Anatomi Manusia. Edisi 24. Singapura: Elsevier.
- Pippin MM, Le JK. Bacterial Conjunctivitis. [Updated 2020 Jul 2]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2020 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK546683/>.
- Ryder EC, Benson S. 2018. Conjunctivitis. StatPearls Publishing. [Online Journal] [Diakses 28 September 2020]. Tersedia dari: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK541034/>
- Sari M. 2021. Hippobroma longiflora. iNaturalist [Website] [diakses 23 September 2021]. Tersedia dari: <https://www.inaturalist.org/photos/109061409>
- Shafiqur R, et al. 2017. Animal carcass disposal options. *North Dakota State University*. 1–8. Tersedia dari: <https://www.ag.ndsu.edu/publications/environment-natural-resources/animal-carcass-disposal-options-rendering-incineration-burial-composting>.
- Shumway CL, Motlagh M, Wade M. Anatomy. 2021. Head and Neck, Eye Conjunctiva. StatPearls Publishing. [Online Journal] [Diakses 23 April

- 2022]. Tersedia dari: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK519502/>
- Simanjuntak AH. 2020. Antibacterial Activity of Ethanolic Extract of Kitolod (Hippobromalongiflora) Leaf Against Staphylococcus aureus and Salmonella typhi. *Asian Journal of Pharmaceutical Research and Development*. 8(1):86–93.
- Song M, *et al.* 2021. Plant Natural Flavonoids Against Multidrug Resistant Pathogens. *Advanced Science*. 8(15):1–11.
- Stephens J. 2001. Lobund-Wistar Rat. National Cancer Institute. [Online Journal] [diakses 21 September 2021]. Tersedia dari: <https://visualsonline.cancer.gov/details.cfm?imageid=2568>.
- Tallon B. 2010. Conjunctivitis Pathology. Conjunctivitis pathology | DermNet NZ. [Online Journal] [Diakses 2 Oct 2021]. Tersedia dari: <https://dermnetnz.org/topics/conjunctivitis-pathology>.
- Yusmaniar, Wardiyah, Nida, K. 2017. *Mikrobiologi dan Parasitologi*. Jakarta: Kemenkes RI.
- Zarta AR, *et al.* 2018. Short communication: Identification and evaluation of bioactivity in forest plants used for medicinal purposes by the Kutai community of east Kalimantan, Indonesia. *Biodiversitas*. 19(1):253–259.