

BAB IV

HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

A. Hasil Penelitian

Dari hasil perhitungan jumlah neutrofil (%) pada mencit *Balb/c* yang diinfeksi *Klebsiella pneumoniae*, diperoleh hasil sebagai berikut.

Tabel 4.1 Hasil analisis deskriptif rata-rata jumlah neutrofil (%) mencit *Balb/c* yang diinfeksi *Klebsiella pneumoniae* dengan berbagai perlakuan.

Kelompok	n	Rata-rata (%) ± SD
C1	5	22.540 ± 10.2851*
C2	5	23.620 ± 15.9972
E1	5	39.160 ± 36.5350
E2	5	38.340 ± 35.6776
E3	5	37.140 ± 36.8999*
E4	5	71.020 ± 39.7116

Keterangan :

N : jumlah mencit *Balb/c*; **SD** : standar deviasi.

C1 : tidak diberi perlakuan apapun (kontrol negatif)

C2 : diinfeksi *Klebsiella pneumoniae* tanpa diberi ekstrak daun sirih

E1 : diinfeksi + diberi ekstrak daun sirih 100mg/kgBB

E2 : diinfeksi + diberi ekstrak daun sirih (*Piper betle Linn*) 200mg/kgBB

E3 : diinfeksi + diberi ekstrak daun sirih (*Piper betle Linn*) 400mg/kgBB

E4 : diinfeksi + diberi amoksisilin 1,3 mg/kgBB.

Pada Tabel 4.1 diperoleh rata-rata jumlah neutrofil tertinggi adalah pada kelompok E4, yaitu kelompok mencit *Balb/c* yang diinfeksi bakteri *Klebsiella pneumoniae* dan diberi amoksisilin 1.3 mg/kgBB dengan rata-rata

jumlah neutrofil sebesar 71,02 %. Rata-rata jumlah neutrofil terendah adalah pada kelompok C1 yaitu kelompok mencit Balb/c yang tidak diberi perlakuan (kontrol negatif) dengan rata-rata jumlah neutrofil sebesar 22,54%. Tanda bintang (*) pada tabel menunjukkan rata-rata dan standar deviasi dua kelompok yang memiliki perbedaan signifikan.

Hasil analisa statistika menggunakan uji *Kruskal Wallis* menunjukkan $p = 0,429$ ($p > 0,05$), yang berarti bahwa pemberian ekstrak daun sirih *Piper betle Linn* tidak mempengaruhi jumlah neutrofil pada mencit Balb/c yang diinfeksi bakteri *Klebsiella pneumoniae*, sehingga hipotesis ditolak.

Tabel 4.2 Nilai p neutrofil pada kelompok E1 – E4 terhadap kelompok C1 dengan menggunakan analisis statistik *Mann Whitney*.

Kelompok	n	Nilai p terhadap kelompok C1
E1	5	0,342
E2	5	0,530
E3	5	0,602
E4	5	0,045

Hasil analisa statistika dengan menggunakan uji *Mann Whitney* menunjukkan nilai $p > 0,05$ pada kelompok E1, E2, E3. Nilai $p < 0,05$ diperoleh pada kelompok E4, yaitu kelompok mencit Balb/c yang diinfeksi bakteri *Klebsiella pneumoniae* dan diberi amoksisilin 1,3mg/kgBB.

B. Pembahasan

Salah satu komponen terpenting dari respon sistem imun awal pada paru-paru dalam menghadapi infeksi bakteri adalah dengan rekrutmen

neutrofil secara masif (Craig, *et al.*, 2009). Infeksi saluran pernapasan bawah menyebabkan sirkulasi neutrofil atau yang disebut dengan “left shift”, yang disebabkan oleh pelepasan neutrofil secara masif dari sumsum tulang (Marsh, *et al.*, 1967). Akumulasi neutrofil ini menyebabkan respon imun adaptif pada inang (Tateda, *et al.*, 2001). Kurangnya populasi sel neutrofil menyebabkan tidak adekuatnya perlawanan terhadap bakteri pada paru-paru. Pada mencit, kondisi pemulihan pasca neutropenia dapat mengembalikan fungsi pertahanan tubuhnya terhadap patogen (Yamamoto, *et al.*, 2006).

Pada hasil penelitian ini, didapatkan angka neutrofil yang masih tinggi setelah dilakukan analisa hitung jumlah neutrofil pada hari ke tujuh setelah infeksi. Hal ini dapat dikarenakan oleh perjalanan penyakit pneumonia masih berlangsung, sehingga sistem pertahanan tubuh masih terus berjalan dengan terus memproduksi neutrofil dalam jumlah besar. Proses ini merupakan proses alami sistem imun tubuh. Selain itu, tingginya jumlah neutrofil darah mencit juga dapat dikarenakan kurang adekuatnya dosis pemberian ekstrak daun sirih (*Piper betle Linn*), sehingga tidak mampu menurunkan angka kuman paru mencit. Hal ini akan menyebabkan tubuh terus memproduksi neutrofil sebagai pertahanan tubuh.

Peran neutrofil dalam sistem imun meliputi tiga aktivitas kompleks, yaitu memproduksi dan melepaskan granula yang menyimpan molekul dengan aktivitas bakterisidal, melepaskan *reactive oxygen species* (ROS) seperti O_2^- , H_2O_2 , HOCl, dan OH, serta melepaskan *neutrophil extracellular*

traps (NETs) (Sheshachalam, *et al.*, 2014). Granula neutrofil memiliki aktivitas antimikroba yang poten dan sangat bersifat sitotoksik (Lacy, *et al.*, 2014). Ada 3 tipe granula yang semuanya mengandung lisozim dan diklasifikasikan berdasar kandungannya, yaitu granula azurofilik yang mengandung enzim hidrolitik yang poten seperti myeloperoksidasi (MPOs) dan elastase, granula spesifik dengan kadar laktoferin yang tinggi, dan granula gelatin yang memiliki metaloproteinase (Cassatella, *et al.*, 2011).

NETs tersusun dari kromatin dan beberapa komponen granula (Fauler, *et al.*, 2004). Struktur neutrofil ini mampu mengikat bakteri gram negatif dan positif. (Guimaraes-Costa, *et al.*, 2014). Bentuknya menyerupai jaring dan berfungsi untuk menangkap mikroorganisme dan mencegahnya menyebar. Kromatin, yang dilepaskan baik oleh neutrofil mati maupun yang masih teraktivasi, diselimuti oleh histon, enzim granula seperti elastase, dan MPOs yang mampu membunuh mikroorganisme. (Kolaparthi, *et al.*, 2014).

Sekuestrasi atau rekrutmen neutrofil merupakan mekanisme pertahanan antibakteri yang esensial pada paru-paru yang melibatkan beberapa tahap. Tahap tersebut termasuk aktivasi faktor transkripsi, produksi kemokin, regulasi molekul adhesi sel, dan peningkatan interaksi sel (Mai, *et al.*, 2009).

Faktor transkripsi memiliki peran pada pengaturan arus neutrofil menuju paru-paru. Faktor transkripsi atau *transcription factors* adalah protein yang terikat pada daerah promotor DNA dan menginduksi ekspresi gen, salah satunya adalah NF- κ B (Hoffmann, *et al.*, 2006). NF- κ B berperan

sebagai mediator pada rekrutmen neutrofil yang dipicu oleh reaksi dengan lipopolisakarida bakteri (Alcamo, *et al.*, 2001). Ketika bakteri yang memiliki lipopolisakarida masuk secara intratrakhea, akan terjadi translokasi NF- κ B di paru-paru yang kemudian akan disusul dengan arus neutrofil menuju paru-paru (Mizgerd *et al.*, 2004). Beberapa kemokin neutrofil gen, seperti KC (kemokin yang berasal dari keratinosit), MIP-2 (*macrophage inflammatory protein 2*), dan CCXCL5 (CXC ligand 5), memiliki NF- κ B tersebut (Pahl, 1999).

Sekresi kemokin merupakan tahap awal infiltrasi. Kemokin merupakan molekul protein yang mampu menginduksi migrasi kemotaksis neutrofil (Lukacs, *et al.*, 1999). Salah satunya adalah kemokin ELR-positive (ELR⁺) CXC, yang lebih dikenal dengan IL 8, yang akan mengeluarkan kemotaksis neutrofil yang poten (Baggiolini, *et al.*, 1994). Kemokin ELR-positive (ELR⁺) CXC meningkat jumlahnya pada seseorang yang mengalami infeksi bakteri pada paru-paru. Sama halnya dengan manusia, pada mencit ekspresi kemokin ELR⁺ seperti CXCL5 juga akan meningkat pada infeksi paru-paru oleh bakteri intratrakhea (Moser, *et al.*, 1994). Penghambatan pada ELR⁺ akan menghambat migrasi neutrofil ke paru-paru yang dipicu oleh bakteri (Greenberger, *et al.*, 1996).

Mulanya, bakteri masuk dan berinteraksi dengan sel-sel alveolus, termasuk sel epitel alveolus dan makrofag, sehingga memicu sekresi sitokin dan senyawa kimia pemicu neutrofil. Sitokin ini kemudian meningkatkan ekspresi molekul adhesi sel pada kapiler endotel. Hal ini akan menjadi

perantara neutrofil untuk bertransmigrasi menuju rongga alveolus mengikuti gradien kemotaksis. Neutrofil yang bertransmigrasi kemudian akan memproduksi protease, ROS atau *reactive oxygen species*, dan RNS atau *reactive nitrogen species*, yang akan beraksi pada sel yang terinfeksi dan menyebabkan kematian sel yang nekrosis (Jeyaseelan, *et al.*, 2009)

Pada hasil penelitian, didapatkan rata-rata jumlah neutrofil tertinggi adalah pada kelompok E4, yaitu kelompok mencit Balb/c yang diinfeksi bakteri *Klebsiella pneumoniae* dan diberi amoksisilin 1,3mg/kgBB dengan rata-rata jumlah neutrofil sebesar 71,02 %.Kadar neutrofil normal dalam mencit secara umum memiliki range normal 6,7-37,2% (Fox, *et al.*, 1984). Kenaikan jumlah neutrofil melebihi batas normal dimungkinkan karena berbagai hal. Salah satunya adalah pengaruh amoksisilin. Amoksisilin mampu berperan sebagai immunostimulan dengan memberikan stimulasi pada peran neutrofil, baik dalam hal adhesi maupun migrasi (Roques, *et al.*, 1991).

Infeksi bakteri *Klebsiella pneumoniae* terbukti meningkatkan jumlah neutrofil darah. Semua kelompok mencit yang diinfeksi bakteri *Klebsiella pneumoniae* memiliki rata-rata jumlah neutrofil lebih tinggi dibandingkan dengan kelompok kontrol (C1) yang tidak diinfeksi bakteri *Klebsiella pneumoniae*. Hal ini sesuai dengan penelitian histopatologi Arthur *et al.*(2013) yang menyebutkan bahwa lipopolisakarida (LPS) yang dimiliki bakteri *Klebsiella pneumoniae* menyebabkan peningkatan infiltrasi

neutrofil secara signifikan di area sekitar perivaskular paru, jaringan parenkim paru, dan saluran pernapasan.

Efektivitas kerja ekstrak daun sirih dapat dipengaruhi oleh beberapa faktor, baik pada tanaman sirih yang digunakan sebagai ekstrak maupun pelarutnya. Hal ini terkait dengan kandungan senyawa kimia yang nantinya akan ada pada ekstrak. Ekstrak daun sirih hijau yang diekstrak dengan etanol lebih efektif daripada daun sirih yang diekstrak dengan pelarut air dalam menghambat pertumbuhan bakteri patogen (Kaveti, *et al.*, 2011).

Kandungan kimia pada tanaman sirih sebagai bahan baku jugadipengaruhi oleh beberapa faktor. Lingkungan tumbuh dan kondisi panen tanaman sangat mempengaruhi kandungan senyawa kimianya (Hanudin, *et al.*, 2012). Kandungan tannin pada daun dapat berbeda antara daun usia muda, usia sedang dan usia tua (Kharismawati, *et al.*, 2009). Semakin tua (masak) usia daun, kadar tannin yang ada di dalamnya semakin besar (Angela, *et al.*, 2004). Selain tannin, kandungan senyawa kimia lain juga dipengaruhi beberapa faktor. Kandungan fenolik dan flavonoid total dapat dipengaruhi oleh unsur hara dan intensitas cahaya matahari saat pertumbuhan tanaman, serta umur pemanenan tanaman (Wismarini, *et al.*, 2012).

Pada penelitian ini didapatkan beberapa hal yang menjadi kekurangan dalam penelitian, salah satunya adalah tidak dilakukan pengujian kadar tiap senyawa organik pada ekstrak daun sirih. Selain itu, pengendalian terhadap kontaminasi belum dilakukan seutuhnya.