

Pendahuluan

Alam Indonesia sangat kaya dengan berbagai jenis tumbuhan yang berkhasiat, namun pemanfaatannya belum dilakukan secara optimal. Hal ini disebabkan karena adanya anggapan bahwa pengobatan tradisional adalah pengobatan kuno dan ketinggalan zaman. Usaha pengembangan tanaman untuk pengobatan perlu dilakukan mengingat bahwa tanaman mudah diperoleh dan murah, tetapi penggunaan tanaman untuk pengobatan perlu ditunjang oleh data-data penelitian dari tanaman tersebut sehingga khasiatnya secara ilmiah tidak diragukan lagi dan dapat dipertanggungjawabkan. Hal ini tentu akan lebih mendorong penggunaan tanaman sebagai obat secara meluas oleh masyarakat¹.

Selama beberapa tahun ini penyakit infeksi saluran pernafasan akut (ISPA) selalu menempati urutan pertama dalam 10 besar penyakit di puskesmas se-Yogyakarta. Hingga bulan Oktober 2010, berdasarkan laporan bulanan data

kesakitan jumlah penderita ISPA mencapai 48.351 orang (20,8 % dari seluruh penderita baru yang berkunjung ke puskesmas) dan jumlah penderita pneumonia sebanyak 747 orang (0,3%).

Beberapa antibiotik yang sering digunakan untuk pengobatan pneumonia yaitu antibiotic beta-laktam (Penisilin, Benzil penisilin, Fenoksimetil penisilin, Ampisilin, Amoksisilin, Coamoksiklav, Penisilin antipseudomonas), Makrolida (Eritromisin, Azitromisin, Klaritromisin), Aminoglikosida (Streptomisin, Gentamisin, Amikasin, Kanamisin, Neomisin, dan Paramomisin)².

Daun sirih (*Piper betle Linn*) telah menjadi sumber yang menjanjikan. Hal ini dapat terlihat dari potensi sirih sebagai antibiotik yang memiliki keuntungan dalam hal keamanan, ketersediaan, serta menurunkan resiko dari efek samping dan ketergantungan terhadap obat sintetik³. Oleh karena itu, penting dilakukan penelitian efektivitas ekstrak daun sirih

untuk mengobati mencit yang diinfeksi *Klebsiella pneumoniae*.

Bahan dan Cara

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorik dengan rancangan *the post test-only control group design* yang menggunakan binatang percobaan sebagai obyek penelitian. Perlakuan berupa pemberian larutan ekstrak daun sirih yang dibuat di Laboratorium Farmasi FKIK UMY pada mencit *Balb/C* yang diinfeksi dengan bakteri *Klebsiella pneumoniae*. Parameter pengukuran variabel berupa jumlah leukosit dan persentase limfosit.

Sampel yang diuji adalah 30 ekor mencit *Balb/C* dengan 5 ekor pada masing-masing kelompok. Terdapat 6 kelompok yaitu; C1: tidak diberi perlakuan apapun (kontrol negatif); C2: diinfeksi *Klebsiella pneumoniae* (kontrol positif); E1 - E3: diinfeksi *Klebsiella pneumoniae* dan diberi ekstrak daun sirih (*Piper betle Linn*) 100 mg/kgBB; 200 mg/kgBB; 400 mg/kgBB;

E4: diinfeksi *Klebsiella pneumoniae* dan diberi eritromisin 3,25 mg.

Sebagai kriteria inklusi adalah mencit yang berumur 2,5-3 bulan dengan berat badan 20-25 gram, galur murni *Balb/C*, berjenis kelamin jantan, aktif sebelum diinfeksi *Klebsiella pneumoniae*, sehat dan tidak ada kelainan anatomis. Adapun ketika pengambilan sampel mencit mati sebelum tiba waktu observasi, maka dikeluarkan dari sampel penelitian.

Sebagai variabel bebas adalah pemberian larutan ekstrak daun sirih (*Piper betle Linn*) dengan dosis 100 mg/kg BB, 200 mg/kg BB, 400 mg/kg BB dan pemberian obat standar eritromisin 3,25 mg; sedang variabel tergantung adalah jumlah leukosit dan persentase limfosit. Variabel tak dikendalikan yakni variasi genetik dan metabolisme mencit. Lalu sebagai variabel terkontrol adalah mencit *Balb/C* umur 2,5-3 bulan dengan berat badan rata-rata 20-25 gram; kondisi kandang, pakan, dan minum sama; serta *Klebsiella pneumoniae* sebagai imunogen.

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah bakteri *Klebsiella pneumoniae*, larutan ekstrak daun sirih (*Piper betle Linn*), pakan ternak standar untuk mencit *Balb/C*, sampel berupa darah mencit, reagen yang digunakan adalah alkohol 70%, larutan Giemsa, antikoagulasi EDTA, larutan pengencer Turk, minyak imersi, media McConkey, NaCl fisiologis steril, eter, dan heparin.

Alat yang digunakan pada penelitian ini adalah untuk pemeliharaan mencit: kandang mencit, ram kawat, alas kandang, tempat makanan, tempat minuman, sikat; untuk perlakuan pada mencit: neraca analitik, mikropipet, vortex, kaca objek, sonde lambung, spuit 1cc steril, pipet volume, pipet pasteur, pipet eppendorf, petridish, inkubator, ose; untuk pengambilan data: sarung tangan, pinset, spuit 3 ml, seperangkat alat bedah steril, alat homogenisasi, mikroskop cahaya, alat hemositometer yang terdiri dari bilik hitung *Improved Neubaur* dan pipet leukosit.

Penelitian telah dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Yogyakarta pada bulan Maret – Juni 2015.

Pelaksanaannya diawali dengan pembuatan ekstrak daun sirih, yaitu dengan mengeringkan daun sirih kemudian dibuat dalam bentuk serbuk, kemudian serbuk ditimbang sesuai kebutuhan dosis dan dimaserasi dengan menggunakan pelarut metanol, selama 3 jam dan sebanyak 10 siklus, suhu dijaga pada 65 derajat *celcius*. Kemudian ekstrak disaring dengan menggunakan corong buchner untuk mendapatkan filtratnya. Ekstrak yang diperoleh dipekatkan dengan menggunakan rotary evaporat sampai diperoleh ekstrak kental⁴.

Prosedur pembuatan suspensi bakteri *Klebsiella pneumoniae* adalah *Klebsiella pneumoniae* ditanam dalam kaldu brain heart induction (BHI) yang mengandung 100µg/ml ampisilin dan diinkubasikan dalam 37 derajat *celcius*

selama 18 jam. Kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 10.000 rpm dalam 15 menit. Dicuci sebanyak dua kali dalam larutan NaCl 0,85%. Setelah pencucian kedua, diencerkan dengan NaCl 0,85% hingga mendapatkan volume 1/10 dari volume awal, sehingga menghasilkan inokulum yang dapat diinfeksi. Jumlah koloni dikonfirmasi dengan menggunakan metode *spiral plate* dalam *tryptic soy agar* (TSA).

Cara pengumpulan data meliputi langkah-langkah: sampel diadaptasi selama 1 minggu di laboratorium dan diberi pakan standar; dilakukan pengelompokan dengan acak sederhana, 30 ekor mencit dibagi dalam 6 kelompok; kelompok E1-E4 diberi pakan standar dan larutan ekstrak daun sirih (*Piper betle Linn*) dengan dosis 100 mg/kg BB/hari untuk E1, 200 mg/kg BB/hari untuk E2, 400 mg/kg BB/hari untuk E3, dan larutan eritromisin 3,25 mg. Setelah 12 jam infeksi *Klebsiella pneumoniae* secara intranasal pada hari ke-1, kemudian diberi

perlakuan dengan dosis yang sudah ditetapkan selama 7 hari. Pada hari ke-7 semua mencit diambil darahnya melalui pembuluh darah retroorbital untuk pemeriksaan jumlah leukosit dan darah dari ekor mencit untuk dihitung persentase limfositnya; kelompok C2 diberi pakan standar selama 7 hari, dilakukan infeksi *Klebsiella pneumoniae* secara intranasal namun tidak diberi larutan ekstrak daun sirih maupun larutan eritromisin dan kelompok C1 merupakan kontrol sehat tanpa perlakuan kemudian dilakukan pemeriksaan yang sama seperti kelompok lainnya.

Pemeriksaan jumlah leukosit dilakukan dengan cara: darah mencit yang diambil dari retroorbital diberi antikoagulasi EDTA; dilakukan pemeriksaan jumlah leukosit dengan menggunakan hemositometer yang terdiri dari bilik hitung Improved Neubaur; hitung leukosit mm^3 = jumlah sel yang dihitung dalam 4 kotak besar x pengenceran (20) dibagi volume kotak

besar ($0,4 \text{ mm}^3$) dengan satuan jumlah leukosit/ mm^3 .

Prosedur pemeriksaan persentase dan gambaran morfologi limfosit⁵: meneteskan darah pada kaca objek; preparat dibiarkan kering di udara dan beri label, preparat yang telah kering difiksasi dengan methanol 90%, dikeringkan kembali, preparat diberi pewarnaan dengan larutan Giemsa dan didiamkan selama 20-25 menit; mencuci preparat dengan air mengalir dan preparat dikeringkan, preparat sediaan apus darah tepi yang sudah kering dibaca di bawah mikroskop cahaya untuk dihitung persentase limfositnya dan hitung jenis leukosit lainnya.

Analisis data statistik dengan menggunakan *software SPSS* versi 15. Untuk uji normalitas menggunakan uji *Shapiro-Wilk* karena sampel yang digunakan sedikit (<50) kemudian data tersebut diuji dengan uji *One way ANOVA* karena distribusi data normal untuk jumlah leukosit dan uji *Kruskal*

Wallis serta *Mann Whitney* untuk persentase limfosit karena distribusi data tidak normal.

Hasil Penelitian

Dari perhitungan jumlah leukosit dan persentase limfosit mencit *Balb/C* yang diinfeksi *Klebsiella pneumoniae* diperoleh hasil sebagai berikut:

Tabel 1. Hasil analisis deskriptif rata-rata jumlah leukosit mencit *Balb/C* yang diinfeksi *Klebsiella pneumoniae* dengan berbagai perlakuan

Nama Kelompok	n	Rata-rata \pm SD (mm^3)
C1	5	59,8000 \pm 24,98399
C2	5	47,4000 \pm 11,32696
E1	5	51,0000 \pm 21,15420
E2	5	32,0000 \pm 11,06797
E3	5	26,4000 \pm 12,77889
E4	5	44,0000 \pm 27,21213

Dari hasil analisis deskriptif ini, terjadi penurunan jumlah leukosit pada semua kelompok perlakuan dibandingkan kelompok kontrol negatif (C1), jumlah leukosit yang paling menurun terdapat pada kelompok E3, yaitu kelompok yang

diinfeksi *Klebsiella pneumoniae* dan diberi ekstrak daun sirih (*Piper betle Linn*) 400 mg/kgBB. Sedangkan kelompok perlakuan yang memiliki jumlah leukosit paling tinggi adalah kelompok E1 yaitu kelompok yang diinfeksi *Klebsiella pneumoniae* dan diberi ekstrak daun sirih (*Piper betle Linn*) 100 mg/kgBB.

Hasil statistika menggunakan *One way ANOVA* menunjukkan nilai $p=0,107$ ($p>0,05$), artinya perbedaan derajat dosis pemberian ekstrak daun sirih (*Piper betle Linn*) tidak mempengaruhi jumlah leukosit.

Tabel 2. Hasil analisis deskriptif rata-rata persentase limfosit mencit *Balb/C* yang diinfeksi *Klebsiella pneumoniae* dengan berbagai perlakuan

Nama Kelompok	N	Rata-rata \pm SD (mm ³)
C1	5	77,4600 \pm 10,28509
C2	5	76,3800 \pm 15,99725
E1	5	60,8400 \pm 36,53502
E2	5	61,6600 \pm 35,67763
E3	5	62,8600 \pm 36,89991
E4	5	28,9800 \pm 39,71161

Dari hasil analisis deskriptif ini, terjadi penurunan persentase limfosit pada semua kelompok perlakuan dibandingkan kelompok kontrol negatif (C1), persentase limfosit yang paling menurun terdapat pada kelompok E4, yaitu kelompok yang diinfeksi *Klebsiella pneumoniae* dan diberi eritromisin 3,25 mg. Sedangkan kelompok perlakuan yang memiliki persentase limfosit paling tinggi adalah kelompok E3 yaitu kelompok yang diinfeksi *Klebsiella pneumoniae* dan diberi ekstrak daun sirih (*Piper betle Linn*) 400 mg/kgBB.

Hasil statistika menggunakan *Kruskal Wallis* menunjukkan nilai $p=0,429$ ($p>0,05$), artinya perbedaan derajat dosis pemberian ekstrak daun sirih (*Piper betle Linn*) tidak mempengaruhi persentase limfosit.

Apabila setiap kelompok perlakuan dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif, maka hasil statistiknya sebagai berikut:

Tabel 3. Nilai p limfosit kelompok E1 – E4 terhadap kelompok C1 dengan

menggunakan analisis statistik Mann-Whitney

Nama Kelompok	n	Nilai p terhadap kelompok C1
E1	5	0,624
E2	5	0,530
E3	5	0,602
E4	5	0,045

Pada tabel 3, terdapat satu kelompok perlakuan yang menunjukkan pengaruh limfosit bermakna dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif, yaitu kelompok E4. Kelompok E4 yaitu kelompok yang diinfeksi *Klebsiella pneumoniae* dan diberi eritromisin 3,25 mg dengan nilai $p=0,045$ ($p<0,05$). Namun nilai bermakna tersebut dikarenakan terjadi penurunan persentase limfosit yang signifikan bukan peningkatan persentase limfosit seperti yang diharapkan dan sesuai teori.

Diskusi

Berdasarkan hasil uji *One way ANOVA* terhadap perbandingan derajat dosis pemberian ekstrak daun sirih (*Piper*

betle Linn) dengan jumlah leukosit menunjukkan hasil dengan nilai $p=0,107$ ($p>0,05$), artinya perbedaan derajat dosis pemberian ekstrak daun sirih (*Piper betle Linn*) tidak mempengaruhi jumlah leukosit.

Selanjutnya dilakukan uji *Kruskal Wallis* terhadap perbandingan derajat dosis pemberian ekstrak daun sirih (*Piper betle Linn*) dengan persentase limfosit, hasil uji tersebut menunjukkan hasil dengan nilai $p=0,429$ ($p>0,05$), artinya perbedaan derajat dosis pemberian ekstrak daun sirih (*Piper betle Linn*) tidak mempengaruhi persentase limfosit. Namun berdasarkan uji *Mann Whitney* terhadap perbandingan kelompok kontrol negatif dengan kelompok perlakuan, didapatkan hasil terdapat satu kelompok perlakuan yang menunjukkan pengaruh limfosit bermakna dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif, yaitu kelompok E4 dengan nilai $p=0,045$ ($p<0,05$). Namun nilai bermakna tersebut dikarenakan terjadi penurunan persentase limfosit yang signifikan bukan

peningkatan persentase limfosit seperti yang diharapkan dan sesuai teori.

Strain baru dari *Klebsiella pneumoniae* kebal terhadap berbagai jenis antibiotic dan sampai sekarang masih dilakukan penelitian untuk menemukan obat yang tepat untuk menghambat aktivitas atau bahkan membunuh bakteri tersebut⁵. Selain itu *Klebsiella pneumoniae* juga memiliki enzim urease dan enzim sitrat permiase serta enzim ESBL (*Extended Spektrum Beta Lactamase*) yang dapat melumpuhkan kerja berbagai jenis antibiotic⁶.

Daun sirih mengandung 4,2 % minyak atsiri yang sebagian besar terdiri dari *Chavicol para allyphenol* turunan dari *Chavica betel*. Isomer *Euganol allypyrocatechine*, *Cineol methyl euganol* dan *Caryophyllen*, kavikol, kavibekol, estragol, terpinen⁷.

Minyak atsiri dari daun sirih mengandung 30% fenol dan beberapa derivatnya. Persenyawaan fenol ini diketahui memiliki aktivitas antibakteri

dan minyak atsiri dari daun sirih juga dapat digunakan sebagai antijamur dan antioksidan. Minyak atsiri dari daun sirih terdiri dari kavikol, eugenol, dan sineol⁸.

Karvakol bersifat sebagai desinfektan dan antijamur sehingga bisa digunakan sebagai antiseptik, euganol dan *methyl-euganol* dapat digunakan untuk mengurangi sakit gigi⁹.

Selain itu di dalam daun sirih juga terdapat flavanoid, saponin, dan tannin. Saponin dan tannin bersifat sebagai antiseptic pada luka permukaan, bekerja sebagai bakteristatik yang biasanya digunakan untuk infeksi pada kulit, mukosa dan melawan infeksi pada luka¹⁰. Flavanoid selain berfungsi sebagai bakteristatik juga berfungsi sebagai anti inflamasi. Daun sirih antara lain mengandung kavikol dan kavibetol yang merupakan turunan dari fenol yang mempunyai daya antibakteri lima kali lipat dari fenol biasa terhadap *Staphylococcus aureus*¹¹.

Cara kerja fenol dalam membunuh mikroorganisme yaitu dengan cara mendenaturasi protein sel. Dengan terdenaturasinya protein sel, maka semua aktivitas metabolisme sel dikatalisis oleh enzim yang merupakan suatu protein.

Kelemahan pada penelitian ini adalah tidak dilakukannya tes darah pada mencit sebelum diberikan perlakuan terapi untuk menentukan terjadi tidaknya proses infeksi setelah diberikan infeksi bakteri *Klebsiella pneumoniae* secara intranasal. Selain itu pada tahap pembuatan ekstrak daun sirih (*Piper betle Linn*) terjadi beberapa proses yang tidak memenuhi standar seperti pada tahap pengeringan daun yang terpapar sinar matahari langsung sehingga ada kemungkinan senyawa aktif yang diperlukan untuk antibiotik ini dikhawatirkan habis terbakar sinar matahari langsung. Disamping itu, tingkat stres hewan uji dalam penelitian ini berarti mencit *Balb/C* juga mempengaruhi respon imun sehingga jumlah leukosit dan persentase limfosit tidak berespon sesuai

harapan. Maka dari itu perlu untuk dilakukannya penelitian lebih lanjut mengenai pengaruh ekstrak daun sirih (*Piper betle Linn*) terhadap hewan uji yang diinfeksi *Klebsiella pneumoniae*.

Kesimpulan

Hasil penelitian ini dapat disimpulkan sebagai berikut:

1. Pemberian ekstrak daun sirih (*Piper betle Linn*) tidak meningkatkan jumlah leukosit pada mencit *Balb/C* yang diinfeksi *Klebsiella pneumoniae*.
2. Pemberian ekstrak daun sirih (*Piper betle Linn*) tidak meningkatkan persentase limfosit pada mencit *Balb/C* yang diinfeksi *Klebsiella pneumoniae*.

Saran

1. Perlu dilakukan penelitian lain untuk membuktikan efektivitas pemberian ekstrak daun sirih (*Piper betle Linn*) terhadap jumlah leukosit dan persentase limfosit pada hewan uji lain yang diinfeksi *Klebsiella*

- pneumoniae* karena mencit *Balb/C* mudah stres, mungkin jika dilakukan penelitian dengan hewan lain yang tingkat stresnya lebih rendah keberhasilan penelitiannya lebih besar.
2. Perlu dilakukan pengawasan terhadap kondisi sanitasi lingkungan, kondisi pakan dan air minum, serta isolasi setiap kelompok untuk menjaga agar tidak terjadi kontaminasi.
 3. Pada penelitian selanjutnya, perlu ditambah jumlah sampel dan dosis ekstrak daun sirih (*Piper betle Linn*) dalam setiap kelompok perlakuan agar tingkat kevalidan lebih tinggi.
 4. Perlu adanya standar diagnosis pasti agar tidak terjadi penginfeksi ulang pada mencit.

Daftar pustaka

1. Elya, B dan Soemiati, A. (2002). Uji Pendahuluan Efek Kombinasi Antijamur Infus Daun Sirih (*Piper Betle L.*), Kulit Buah Delima (*Punica Granatum L.*), dan Rimpang Kunyit (*Curcuma Domestica Val.*) Terhadap Jamur Candida.
2. Dartnell, J. (2003). *Therapeutic guidelines : antibiotic. 12th ed victoria : The. Guidelines Limited.*
3. Caburian, A. B. (2010). Characterization and Evaluation of Antimicrobial Activity of the Essential Oil from the Leaves of Piper betle L. *E-International Scientific Research Journal*, 2(1), 2-13.
4. Chakraborty D. (2011). Antimicrobial, antioxidative and antihemolytic activity of Piper betle leaf extracts. *Int. J. Pharm. Pharm.Sci*, 192-199.
5. Carlet J. (2000). *Antibiotic management of severe infections incritically ill patients.* Dalam: Dhainaut J-F, Penyunting Thijs LG, Park G. *Septic Shock*, 1st ed. London. WBSaunders, p.445-60.
6. Yinnon. (1996). community versus nosocomial infection. *Klebsiella bacteraemia*, 89:933-41.

7. Sastroamidjojo, S. (1997). *Obat Asli Indonesia*, Dian Rakyat, Jakarta.
8. arwata, O., Rita, W.S., dan Yoga, R. (2009). Isolasi Dan Uji Antiradikal BebasMinyak Atsiri Pada Daun Sirih (*Piper Betle Linn*) Secara Spektroskopi UltraViolet-Tampak. *Jurnal Kimia 3 (1), Januari 2009 : 7-13* Bali: Jurusan KimiaFMIPA Universitas Udayana, Bukit Jimbaran.
9. Syukur, C. dan Hernani. (1999). *Budidaya Tanaman Obat Tradisional*. Jakarta: PT. Penebar Swadaya.
10. Mursito, B. (2002). *Ramuan Tradisional Untuk Penyakit Malaria*. Jakarta: Penebar Swadaya.
11. Kartasapoetra,G. (1992). *Budidaya Tanaman Berkhasiat Obat*, Rineka Cipta, Jakarta. 25-26.