

BAB VI

PEMBAHASAN

Uji diare yang dilakukan adalah dengan mengukur sekresi cairan dalam lumen usus yang diketahui dengan mengukur berat usus terligasi sebelum dan sesudah perlakuan. Penelitian ini menggunakan metode *Mice Ligated Ileal Loop* (Sumarno, 2007), yaitu dengan mematikan mencit terlebih dahulu sebelum mengambil ususnya dan kemudian memapar usus dengan BHI dan *S. flexneri* di luar tubuh mencit atau secara *ex vivo*. Metode ini digunakan sebagai modifikasi dari metode *rabbit ileal loop* (Everest et al, 1993) yang sifatnya traumatik (menyiksa hewan), yaitu dengan membedah dan menginfeksi kelinci yang dianestesi dan dibiarkan hidup.

Isolat *S. flexneri* diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Untuk mendapat jumlah kuman yang cukup untuk menghasilkan toksin terhadap enterosit usus, *S. flexneri* yang dipakai diinkubasi dulu dalam BHI selama 24 jam, lalu didiamkan dalam *water bath* selama 4 jam. Pemberian perlakuan dilakukan selama 30 menit dengan penelitian sebelumnya sebagai dasar waktu pengamatan diare, yaitu sesuai dengan desain Sumarno (2011), jurnal Walsh (2011), Puhar (2011) serta Savitri (2011) bahwa diare terjadi pada fase awal perjalanan penyakit shigellosis yaitu hitungan 90 menit pertama atau maksimal 1-2 hari setelah inkubasi 18-24 jam. Berat usus terligasi diukur setiap 5 menit untuk mengetahui pada menit ke berapa *S. flexneri* memberikan efek diare terhadap usus. Oleh karena sampel yang digunakan memiliki berat yang berbeda-beda, data yang digunakan adalah penambahan berat usus terligasi setiap 5 menit pengukuran.

Berdasarkan tabel 5.2, didapatkan adanya penurunan berat usus terligasi pada semua sampel usus pada menit ke-5 perlakuan. Dari hasil tersebut dapat dijelaskan bahwa pada 5 menit pertama terjadi perpindahan cairan usus ke lingkungan luar usus yang mungkin disebabkan karena osmolaritas cairan RPMI yang lebih tinggi. Pada menit ke-15 hingga menit ke-20, tampak bahwa penambahan berat usus terligasi pada kelompok ileum yang dipapar lebih besar dibandingkan kelompok kontrolnya. Kemudian pada menit ke-25, penambahan berat pada kelompok ileum yang dipapar menjadi lebih kecil dibandingkan dengan kontrolnya. Namun pada menit ke-30, kelompok ileum yang dipapar kembali menunjukkan peningkatan yang lebih besar dibandingkan kontrolnya. Pada menit ke-30, ileum kontrol mengalami penurunan rata-rata berat usus, mungkin telah terjadi kerusakan jaringan akibat dimulainya pembusukan yang menyebabkan cairan keluar menuju RPMI pada salah satu atau sebagian sampel. Pola penambahan berat yang fluktuatif menyebabkan sulitnya menentukan waktu efek maksimal paparan terhadap ileum mencit pada 30 menit perlakuan. Namun jika dilihat dari tabel 5.3 dan gambar 5.2, yaitu total penambahan berat usus terligasi dari menit ke-0 hingga menit ke-30 pengukuran, kelompok ileum yang dipapar *S. flexneri* memiliki penambahan berat yang lebih besar dibandingkan kelompok ileum kontrol. Pada uji komparasi dengan uji *t-test* tidak berpasangan yang ditunjukkan pada tabel 5.4, tidak didapatkan perbedaan yang signifikan. Dapat disimpulkan bahwa terdapat perbedaan penambahan berat usus mencit pada kelompok ileum yang kontrol dengan kelompok ileum yang dipapar, namun perbedaannya tidak signifikan.

Kelompok colon yang dipapar *S. flexneri* menunjukkan penambahan berat yang lebih besar dibandingkan dengan kelompok kontrolnya yang mana

perbedaan itu semakin menonjol mulai dari menit ke-20 hingga menit ke-30 pengukuran (tabel 5.2 dan gambar 5.1). Perbedaan penambahan berat colon yang paling besar adalah pada menit ke-30. Berdasarkan tabel 5.3 dan gambar 5.2, total penambahan berat kelompok colon yang dipapar lebih besar dibandingkan kelompok kontrolnya. Uji komparasi yang ditunjukkan pada tabel 5.4 menunjukkan tidak terdapat perbedaan yang signifikan antara keduanya. Dapat disimpulkan bahwa terdapat perbedaan yang tidak signifikan pada perbandingan kelompok colon kontrol negatif dengan kelompok colon yang dipapar *S. flexneri* dengan puncak pengaruh paparan pada menit ke-30.

Jika membandingkan kelompok ileum dengan colon yang dipapar *S. flexneri*, berdasarkan tabel 5.2 dan gambar 5.1, kelompok ileum memiliki penambahan berat yang lebih besar dibandingkan dengan kelompok colon dengan perbedaan penambahan yang tajam pada menit ke-15. Namun, pada menit ke-25 penambahan berat colon yang dipapar *S. flexneri* meningkat lebih besar dan mencapai puncak pada menit ke-30. Tabel 5.3 dan gambar 5.2 menunjukkan rata-rata penambahan berat usus terligasi pada akhir penelitian pada kelompok ileum yang dipapar *S. flexneri* lebih besar dibandingkan dengan kelompok colon. Uji komparasi menunjukkan bahwa tidak terdapat perbedaan yang signifikan antara keduanya. Dapat disimpulkan bahwa terdapat perbedaan pengaruh paparan *S. flexneri* terhadap berat ileum dengan colon mencit, yaitu penambahan berat ileum yang lebih besar dibandingkan colon pada menit ke-15 perlakuan, dan penambahan berat colon yang lebih besar dibandingkan ileum pada menit ke-30, namun perbedaan tersebut tidak signifikan bila dibandingkan dengan dengan uji komparasi *t-test* tidak berpasangan. Terdapat perbedaan pada total penambahan berat pada akhir penelitian, namun tidak menonjol.

Perbedaan yang tidak menonjol tersebut mungkin disebabkan karena ileum memiliki luas permukaan yang lebih besar dibandingkan dengan colon dengan ukuran panjang potongan yang sama.

Hasil histologi diharapkan dapat menjadi tambahan data dalam mengetahui perbedaan pengaruh *S. flexneri* pada ileum dan colon mencit. Namun, temuan histologi menunjukkan adanya tanda-tanda terjadinya pembusukan. Pembusukan tersebut ditandai dengan adanya sel-sel yang telah mengalami nekrosis, diskontinuitas jaringan yang ditunjukkan dengan adanya pelepasan muscularis propria, kerusakan struktur arsitektur vili dari ileum, koagulasi kelenjar colon, dan renggangnya hubungan antar sel epitel yang ditemukan pada kelompok kontrol negatif. Temuan tersebut menyebabkan hasil histologi dari penelitian ini tidak valid untuk dijadikan data tambahan dalam membandingkan pengaruh *S. flexneri* terhadap ileum dan colon mencit. Pembusukan diduga terjadi lebih cepat akibat perendaman usus pada RPMI serta proses penimbangan yang mengharuskan sampel diambil dari RPMI dan dimasukkan lagi. Pengawetan dilakukan segera setelah penimbangan terakhir dilakukan.

Berdasarkan penjelasan sebelumnya, pada uji komparasi didapatkan bahwa pada menit ke-0 hingga menit ke-30 perlakuan tidak didapatkan perbedaan selisih berat yang signifikan antara ileum kontrol negatif dengan ileum yang dipapar *S. flexneri*. Hal ini menunjukkan bahwa tidak atau belum terjadi diare secara optimal, yang mungkin disebabkan karena pada 30 menit perlakuan *S. flexneri* masih dalam tahap penyesuaian dengan lingkungan di dalam usus (fase lag) dan belum memproduksi enterotoksin secara optimal. Selain itu, efek enterotoksin *S. flexneri* tidak memainkan peran dalam mengganggu fungsi *barrier*

dan proses inflamasi pada ileum sehingga kurang bisa menyebabkan *watery diarrhea*, yang mana kemampuan tersebut dimiliki oleh enterotoksin *S. dysenteriae* yaitu *Shiga Toxin* (Fiorentino et al., 2014). Pada uji komparasi terhadap kelompok colon juga tidak didapatkan adanya perbedaan yang signifikan dari post-injeksi hingga 30 menit perlakuan, namun juga didapatkan adanya total pertambahan berat usus terligasi yang lebih besar pada kelompok colon yang dipapar *S. flexneri* dibandingkan dengan kelompok kontrolnya dengan perbedaan pertambahan yang dimulai dari menit ke-20 dan puncaknya pada menit ke-30. Hal ini menunjukkan bahwa tidak atau belum terjadi secara optimal yang mungkin disebabkan karena proses inflamasi yang mengawali patogenesis dari *S. flexneri* pada colon belum sepenuhnya terjadi. Puncak pertambahan berat colon yang dipapar pada menit ke-30 menunjukkan bahwa mungkin pada menit ke-30 mulai muncul efek dari paparan *S. flexneri* yang terus meningkat hingga menit-menit berikutnya. Seperti halnya pada gambaran histologi ileum, gambaran histologi colon juga menunjukkan adanya kerusakan jaringan usus pada kelompok kontrol maupun yang dipapar *S. flexneri* yang mungkin terjadi akibat autolisis dari proses pembusukan. Oleh karena itu, tidak dapat disimpulkan dengan jelas pengaruh *S. flexneri* terhadap kelompok colon, yaitu dengan melihat ada tidaknya kerusakan pada *tight junction*, adanya ulserasi, dan adanya sel PMN di antara sel epitel usus (Fernandez et al, 2003). Pada penelitian oleh Fernandez (2003), dilakukan penelitian pada mencit usia 4 hari secara *in vivo* dengan pengamatan yang dilakukan setelah 6 jam pemaparan. Hasil penelitian menunjukkan adanya pengaruh berupa invasi bakteri, hilangnya koneksi interselular dari epitel usus, dan infiltrasi sel PMN ke sel epitel hingga menyebabkan sel epitel mengalami apoptosis.

Kelemahan pada penelitian ini adalah tidak dilakukan proses identifikasi enterotoksin ShET1 dan ShET2. Selain itu, penginjeksian BHI pada kelompok kontrol dapat meningkatkan risiko pertumbuhan flora normal yang ada di usus mencit. Pada pemeriksaan histologi juga belum meneliti adanya kuman, PMN dan makrofag dengan jumlah abnormal, serta adanya kerancuan yang ditunjukkan dengan adanya diskontinuitas jaringan yang juga terdapat pada kelompok kontrol karena kondisi sediaan yang semakin menurun akibat pemberian perlakuan di luar tubuh makhluk hidup selama lebih dari 30 menit dengan perendaman pada RPMI sehingga diduga telah terjadi autolisis.

ks Berdasarkan data yang didapatkan dari penelitian, terdapat perbedaan pertambahan berat usus terligasi mencit antara ileum dan colon mencit kontrol negatif dengan yang dipapar *S. flexneri*, namun perbedaan tersebut tidak signifikan jika dianalisis dengan menggunakan uji statistik *t-test* tidak berpasangan. Perbedaan tersebut ditunjukkan dengan adanya total pertambahan berat usus terligasi yang berbeda antara kelompok kontrol dengan kelompok yang dipapar *S. flexneri*. Perbedaan yang paling menonjol ditunjukkan pada menit ke-30, yaitu peningkatan pertambahan berat colon yang dipapar *S. flexneri* yang tajam dibandingkan dengan kelompok kontrolnya dan kelompok ileum yang dipapar *S. flexneri*. Data tersebut dapat digunakan sebagai panduan dalam penelitian terkait shigellosis dimana pengamatan pada uji *watery diarrhea* dan disentri akibat paparan *S. flexneri* dengan metode *Mice Ligated Ileal Loop* dilakukan pada lebih dari 30 menit untuk mendapatkan efek bakteri terhadap usus.