

BAB VI

PEMBAHASAN

Dalam penelitian ini, uji diare 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 cara pemberian ketamin pada mencit, mengambil ususnya, kemudian dengan metode *ex vivo* atau di luar tubuh mencit, usus dipapar menggunakan BHI dan *S. dysenteriae* dan *S. sonnei*. Metode ini digunakan sebagai modifikasi dari metode *rabbit ileal loop* (Everest *et al*, 1993) yang bersifat menyiksa hewan, yaitu menginfeksi kelinci yang dianestesi dan dibiarkan hidup kemudian membedahnya.

Isolat *S. dysenteriae* dan *S. sonnei* diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. *S. dysenteriae* dan *S. sonnei* diinkubasi dalam BHI selama 24 jam, lalu didiamkan dalam *water bath* selama 4 jam untuk mendapatkan jumlah kuman yang cukup untuk menghasilkan toksin terhadap enterosit. Pemberian perlakuan dilakukan selama 30 menit sesuai dengan dasar waktu pengamatan diare menurut penelitian yang dilakukan Sumarno (2011), jurnal Walsh (2011), Puhar (2011), dan Savitri (2011), yang menyebutkan bahwa diare terjadi pada fase awal perjalanan penyakit, 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. dysenteriae* dan *S. sonnei* memberikan efek diare terhadap usus. Data yang digunakan adalah penambahan berat usus terligasi setiap 5 menit pengukuran, karena sampel yang digunakan memiliki berat yang berbeda-beda,.

Berdasarkan tabel 5.2, pemaparan usus dengan *S. dysenteriae* dan *S. sonnei* dilakukan pada menit ke-0. Pada menit ke-5, terlihat terjadi penurunan berat dari semua kelompok usus yang dipapar dan telah dimasukkan ke dalam RPMI, yang kemungkinan dikarenakan oleh perpindahan cairan usus dari usus ke media RPMI karena osmolaritasnya yang lebih tinggi. Pada kontrol negatif didapatkan berat usus yang menurun pada menit ke-5, hal ini mungkin disebabkan karena cairan yang ada di dalam lumen usus keluar ke cairan RPMI yang lebih tinggi osmolaritasnya. Pada menit ke-10 sampai ke-25 terjadi peningkatan berat usus mencit, hal ini mungkin dapat terjadi karena adanya suatu zat dalam lumen usus yang menyebabkan cairan tertarik ke lumen. Pada menit ke-30 terjadi penurunan berat usus kembali, di sini mungkin saja mulai terjadi penurunan osmolaritas di dalam lumen usus dan terjadi hal yang berkebalikan dari sebelumnya.

Pertambahan berat usus yang dipapar dengan *S. dysenteriae* pada menit ke-10 lebih kecil daripada pertambahan berat usus pada kelompok kontrol dan kelompok *S. sonnei*, namun pada menit ke 15, didapatkan pertambahan pada kelompok *S. dysenteriae* dimana terjadi penurunan pada kelompok kontrol dan kelompok *S. sonnei*, yang menunjukkan bahwa kelompok usus yang dipapar *S. dysenteriae* mengalami penambahan terbesar. Pada menit ke-20, kelompok usus yang dipapar oleh *S. dysenteriae* mengalami penambahan yang lebih sedikit dibandingkan dengan kelompok *S. sonnei*, namun lebih besar daripada kelompok kontrol. Pada menit ke-25, berat usus dari kelompok yang dipapar *S. dysenteriae*, *S. sonnei*, dan kelompok kontrol semuanya mengalami penambahan, namun penambahan pada kelompok *S. dysenteriae* menunjukkan kenaikan yang paling kecil. Sedangkan pada menit ke-30, kelompok *S.*

dysenteriae mengalami kenaikan yang paling besar dibandingkan dengan dua kelompok lainnya.

Gambar 5.3 menunjukkan penambahan berat usus yang dipapar dengan *S. sonnei* pada menit ke-10 mengalami kenaikan yang lebih besar dibandingkan dengan *S. dysenteriae*, namun lebih kecil daripada kelompok kontrol. Pada menit ke-15, terjadi sedikit penurunan pada kelompok *S. sonnei*, dimana kelompok kontrol mengalami penurunan yang cukup tajam, dan terjadi kenaikan pada kelompok usus yang dipapar *S. dysenteriae*. Pada menit ke-20, terjadi penurunan yang cukup tajam pada penambahan berat kelompok *S. sonnei* dan *S. dysenteriae*, dimana terjadi kenaikan pada kelompok kontrol, yang menunjukkan penurunan berat usus yang dipapar oleh *S. sonnei* adalah yang terbesar. Pada menit ke-25, terjadi penambahan pada berat usus dari ketiga kelompok, namun kenaikan yang terbesar terjadi pada kelompok usus yang dipapar oleh *S. sonnei*. Pada menit ke-30, penurunan penambahan terjadi pada kelompok usus yang dipapar *S. sonnei*.

Pada uji komparasi dengan *One-way Anova* yang ditunjukkan pada tabel 5.4, tidak didapatkan perbedaan yang signifikan. Dapat disimpulkan bahwa terdapat perbedaan penambahan berat usus mencit pada kelompok colon yang kontrol dengan kelompok ileum yang dipapar, namun perbedaannya tidak signifikan. Kelompok colon yang dipapar *S. dysenteriae* dan *S. sonnei* menunjukkan penambahan berat yang fluktuatif dibandingkan dengan kelompok kontrolnya. Perbedaan penambahan berat colon yang paling besar adalah pada menit ke-30 untuk *S. dysenteriae* dan menit ke-25 pada *S. sonnei*.

Untuk mendukung data pada tabel dan gambar sebelumnya, pada tabel 5.3, hasil total rata-rata penambahan berat usus masing-masing kelompok

selama 30 menit perlakuan menunjukkan bahwa pada kelompok usus yang dipapar *S. sonnei* mengalami penambahan berat yang paling besar dibandingkan dengan kelompok kontrol dan kelompok *S. dysenteriae*, sedangkan *S. dysenteriae* mengalami kenaikan yang lebih sedikit dibandingkan kelompok kontrol dan kelompok *S. sonnei*. Namun temuan setelah ditelusuri lebih lanjut, temuan penambahan berat usus tersebut secara statistik tidak signifikan. 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. dysenteriae* dan *S. sonnei* dengan puncak pengaruh paparan pada menit ke-30.

Hasil histopatologi diharapkan dapat menjadi tambahan data dalam mengetahui perbedaan pengaruh *S. dysenteriae* dan *S. sonnei* pada colon mencit. Namun, temuan histopatologi menunjukkan adanya tanda-tanda terjadinya nekrosis. Hal 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 histopatologi dari penelitian ini tidak valid untuk dijadikan data tambahan dalam membandingkan pengaruh *S. dysenteriae* dan *S. sonnei* terhadap colon mencit. Nekrosis diduga terjadi lebih cepat akibat perendaman usus pada RPMI serta proses penimbangan yang mengharuskan sampel dikeluarkan dari cairan RPMI dan dimasukkan kembali. Pengawetan dilakukan segera setelah penimbangan terakhir dilakukan.

Pada uji komparasi yang dilakukan dengan menggunakan One-way Anova, didapatkan bahwa pada menit ke-0 hingga menit ke-30 perlakuan tidak terdapat perbedaan selisih berat yang signifikan antara colon yang dipapar oleh *S. dysenteriae* dan *S. sonnei* dengan kelompok kontrol negatif. Hal ini menunjukkan bahwa tidak atau belum terjadi diare secara optimal, yang mungkin disebabkan karena pada 30 menit perlakuan *S. dysenteriae* dan *S. sonnei* masih dalam tahap penyesuaian dengan lingkungan di dalam usus (fase *lag*) dan belum memproduksi enterotoksin secara optimal (Fiorentino *et al.*, 2014). Dapat disimpulkan dari data yang fluktuatif dari selisih berat colon mencit selama 30 menit penelitian, waktu yang diperlukan untuk melakukan penelitian tersebut adalah lebih dari 30 menit.

Gambaran histopatologi yang didapat dari penelitian menunjukkan adanya kerusakan jaringan usus pada semua kelompok baik kontrol maupun yang telah dipapar oleh *S. sonnei* dan *S. dysenteriae*. Kerusakan yang terjadi mungkin terjadi akibat autolisis dari proses pembusukan. Oleh karena itu, tidak dapat disimpulkan dengan jelas pengaruh *S. dysenteriae* dan *S. sonnei* terhadap 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 histopatologi 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 colon yang dipapar oleh *S. dysenteriae* dan *S. sonnei* dengan mencit kontrol negatif, namun perbedaan tersebut tidak signifikan jika dianalisis dengan menggunakan uji statistik *One-way Anova*. Perbedaan tersebut ditunjukkan dengan adanya total pertambahan berat usus terligasi yang berbeda antara kelompok kontrol dengan kelompok yang dipapar *S. dysenteriae* dan *S. sonnei*. Data tersebut dapat digunakan sebagai panduan dalam penelitian terkait shigellosis dimana pengamatan pada uji disentri akibat paparan *S. dysenteriae* dan *S. sonnei* dengan metode *Mice Ligated Ileal Loop* dilakukan pada lebih dari 30 menit untuk mendapatkan efek bakteri terhadap usus.