

## BAB 6

### PEMBAHASAN

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh pemberian probiotik (*Lactobacillus spp*) terhadap jumlah sel darah putih pada tikus putih jantan galur wistar yang diinduksi LPS *E.coli* serta bagaimana manfaat probiotik sebagai salah satu upaya tindakan preventif terjadinya sepsis. Subyek penelitian ini adalah 21 ekor tikus putih (*Rattus norvegicus*) yang dikelompokkan menjadi 3 kelompok dengan desain penelitian *The Randomized Post Test Only Control Group Design*. Perlakuan terhadap tikus dalam penelitian ini terdiri dari 3 kelompok, yaitu kelompok kontrol negatif (P0) tikus normal dengan pemberian makan dan minum biasa, kelompok kontrol positif (P1) tikus model sepsis yang diinduksi LPS *E. coli*, serta 1 kelompok perlakuan (P2) tikus model sepsis yang diinduksi LPS *E. coli* dan sebelumnya diberikan probiotik (*Lactobacillus spp*) selama 14 hari.

Hasil perhitungan setiap kelompok memerlukan minimal enam ekor tikus. Untuk mengantisipasi adanya tikus yang dieksklusi selama masa penelitian, jumlah sampel untuk setiap kelompok perlakuan ditambah satu ekor sehingga setiap kelompok terdiri dari tujuh ekor tikus. Sejak awal, penelitian telah dilakukan homogenisasi sampel penelitian sehingga faktor-faktor perancu yang mungkin timbul dapat diantisipasi. Selama masa perawatan dan perlakuan sampai proses pengambilan sampel darah jantung tidak didapatkan tikus yang



mengalami penurunan berat badan. Hal ini menunjukkan bahwa subyek penelitian tidak mengalami stres selama masa penelitian.

Penelitian ini dilakukan untuk membuktikan pengaruh pemberian probiotik (*Lactobacillus spp*) terhadap jumlah sel darah putih (leukosit) pada kelompok tikus putih (*Rattus norvegicus*) sebagai upaya tindakan preventif terjadinya kondisi sepsis. Oleh karena itu pemberian probiotik dilakukan selama 14 hari sejak awal penelitian dan pemberian LPS *E.coli* untuk menginduksi sistem imun dilakukan pada hari ke 15.

#### **6.1. Jumlah Sel Darah Putih Pada Kelompok Tikus Putih Normal**

Sel darah putih (leukosit) dibentuk disumsum tulang dari sel-sel progenitor. Pada proses diferensiasi selanjutnya, sel-sel progenitor menjadi golongan yang tidak bergranula yaitu, limfosit T dan B, monosit, dan makrofag, atau golongan yang bergranula yaitu, neutrofil, basofil, dan eosinofil. Peranan sel darah putih adalah untuk mengenali dan melawan mikroorganisme pada reaksi imun dan untuk membantu proses peradangan dan penyembuhan (Corwin, 2007).

Hitung jumlah leukosit merupakan pemeriksaan yang digunakan untuk menunjukkan adanya infeksi dan dapat juga untuk mengikuti perkembangan dari suatu penyakit tertentu. Dua metode yang digunakan untuk menghitung jumlah leukosit yaitu metode manual atau mikroskopis dan otomatis untuk metode elektronik (Corwin, 2007). Dalam penelitian ini menggunakan metode hitung manual (*Improved neubauer*) dengan pengecatan *wright* dan pengamatan menggunakan papan hitung dengan bantuan mikroskop cahaya yang diperbesar 100x.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa hasil hitung sel darah putih (leukosit) pada kelompok tikus putih normal (P0) adalah  $6,99 \times 10^3$  yang menunjukkan rerata hitung sel darah putih (leukosit) dalam batas normal yaitu  $5 \times 10^3 - 25 \times 10^3$  sel/ul (Aboterin dan Oyedayu, 2006). Pada kelompok P0 (kontrol negatif) ini memiliki rerata hitung sel darah putih dalam batas normal karena tidak diberikan perlakuan.

Kelompok tikus putih normal yang tidak diberikan perlakuan apapun merupakan kontrol negatif dalam penelitian. Tikus putih pada kelompok normal ini tidak mengalami penurunan berat badan selama penelitian berlangsung. Selama masa perawatan dan perlakuan sampai proses pengambilan sampel darah jantung tidak didapatkan tikus putih yang mati dan mengalami tanda-tanda adanya kondisi infeksi atau stres pada kelompok tikus putih normal.

Kelompok tikus putih normal tidak mengalami peningkatan atau penurunan jumlah sel darah putih disebabkan oleh tidak adanya perlakuan khusus pada kelompok tersebut. Hal ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Astawan (2010) bahwa hasil hitung kelompok kontrol negatif atau kelompok tikus putih normal menunjukkan rerata nilai sel darah putih dalam batas normal (4.993 sel/l). Hal ini disebabkan oleh tidak adanya faktor khusus yang mampu memengaruhi nilai sel darah putih pada kelompok tikus putih normal.

## **6.2. Jumlah Sel Darah Putih Pada Kelompok Tikus Putih dengan Induksi**

### **LPS *E. coli***

Kelompok LPS merupakan model yang menggambarkan pajanan patogen pada individu sehat, yang dalam penelitian ini digambarkan dengan pemberian LPS *E. coli* pada kelompok tikus sehat sebagai model infeksi bakteri gram

negatif. Pemberian LPS *E. coli* akan memberikan respon inflamasi pada tikus putih yang akan mempengaruhi jumlah sel darah putih (leukosit).

Hasil hitung sel darah putih (leukosit) pada kelompok yang terpapar LPS *E. coli* (P1) menunjukkan adanya peningkatan nilai sel darah putih (leukositosis) dan memiliki rerata paling tinggi diantara kelompok yang lain ( $29.47 \pm 3.06$ ). Dari analisis statistik diketahui bahwa terdapat perbedaan bermakna ( $p < 0,05$ ) antara kelompok P1 dengan kelompok lainnya P0 dan P2. Hal ini dikarenakan pada kelompok P1 tikus putih diinduksi oleh lipopolisakarida (LPS *E. coli*) tanpa diberi probiotik sehingga terjadi peradangan atau inflamasi.

Lipopolisakarida (LPS *E.coli*) adalah kompleks glikolipid yang merupakan komponen utama dinding luar bakteri gram negatif yang mampu menimbulkan stimulus pada sel-sel imun, bersifat endotoksin dan mengikat reseptor permukaan *Cluster of differentiation-14* (CD14) atau *Toll-like receptor-4* (TLR4) yang mengakibatkan sekresi sitokin proinflamatori seperti IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  dan Prostaglandin (Machairas, 2015). Reseptor TNF- $\alpha$  berfungsi sebagai mediator inflamasi endogen dan mengatur banyak respon seluler termasuk aktivasi gen yang terlibat dalam inflamasi, proliferasi sel, dan kematian sel.

Proses inflamasi melibatkan berbagai macam sel, misalnya leukosit yang berfungsi sebagai sel pertahanan tubuh. Sel leukosit seperti neutrofil, eosinofil, basofil, limfosit, monosit berinteraksi satu sama lain dalam proses inflamasi. Pada saat terjadi inflamasi, akan terjadi proses adhesi antara leukosit dan sel endotel yang meningkat sehingga mengakibatkan peningkatan jumlah sel mediator radang seperti leukosit (Prucha, 2015). Adhesi antara leukosit dan sel endotel akan terus meningkat seiring dengan meningkatnya sel mediator radang ke dalam jaringan tubuh tikus. Sebaliknya pada keadaan normal, leukosit hanya

sedikit melekat pada sel endotel saja (Prucha, 2015). Oleh karena itu, induksi LPS *E. coli* mengakibatkan jumlah leukosit pada kelompok P1 lebih meningkat.

Peningkatan nilai sel darah putih (leukosit) disebabkan karena adanya inflamasi yang merupakan mekanisme pertahanan kompleks sebagai reaksi terhadap pertahanan tubuh, memperbaiki kerusakan sel atau jaringan dan memulihkan homeostasis (Sjamsuhidayat, 2010). Adanya peningkatan hitung sel darah putih (leukosit) yang bermakna pada kelompok P1 menunjukkan bahwa LPS berfungsi sebagai model infeksi bakteri gram negatif.

Hal tersebut sesuai dengan hasil penelitian Paim et al. (2011) bahwa kelompok tikus putih yang terinfeksi oleh *Trypanosoma evansi* mengalami kondisi leukositosis, dan menunjukkan adanya peranan leukosit dalam sistem tanggap kebal seluler atau sistem imunitas seluler. Peningkatan jumlah sel darah putih ini terbilang wajar, berkaitan dengan kondisi inflamasi dan bertugas khusus untuk menanggulangi infeksi parasit seperti induksi LPS *E. coli*.

Sepsis berhubungan dengan peningkatan destruksi karena perubahan pada membran sel darah merah dan interaksi dengan sel darah putih serta aktifitas sitokin. Adanya induksi LPS *E. Coli* sebagai model infeksi bakteri gram negatif menyebabkan adanya peningkatan jumlah sel darah putih pada kelompok kontrol positif (P1). Hal ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Garcia (2012) yang menunjukkan bahwa kelompok kontrol positif pada tikus yang diinduksi *Echinostoma paraensei* menunjukkan adanya peningkatan jumlah sel darah putih pada minggu pertama infeksi. Infeksi *E. paraensei* yang menyebabkan infeksi gastrointestinal akan mempengaruhi sistem hematologi pada tikus putih, salah satunya adalah jumlah sel darah putih sebagai lini pertama pertahanan tubuh terhadap kondisi infeksi dan inflamasi (Garcia et al., 2012).

### 6.3. Jumlah Sel Darah Putih Pada Kelompok Tikus Putih dengan Probiotik dan Induksi LPS *E.coli*

Pemberian probiotik selama 14 hari pada kelompok P2 (kelompok perlakuan) diharapkan dapat menekan jumlah bakteri patogen dalam usus, serta meningkatkan respon imunitas tikus putih. Pemberian probiotik *Lactobacillus spp* mampu memicu pertumbuhan dan menstimulasi pembentukan sel leukosit dengan menstimulasi imunitas seluler (Kimura, 2014). Dalam studi yang dilakukan oleh Kimura (2014) dijelaskan bahwa probiotik berkontribusi dalam keseimbangan flora mikroorganisme dalam usus, serta mampu meningkatkan imunitas atau daya tahan tubuh dengan menstimulasi aktivasi sistem imunitas seluler seperti leukosit, limfosit, dan neutrofil.

Probiotik mampu mempengaruhi sistem imun host dengan cara yang berbeda yaitu, dengan meningkatkan integritas barrier epitelial, menguatkan imunitas sel, meningkatkan sel dendrit serta komponen leukosit seperti limfosit T, serta mampu meningkatkan aktifitas fagosit leukosit dalam sirkulasi darah (Rowland, 2010). Dijelaskan bahwa bakteri probiotik asam laktat (*Lactobacillus spp*) dapat meningkatkan pertahanan tubuh inang dengan cara menguatkan sel darah putih sebagai sistem imunitas seluler, sehingga dapat meningkatkan pertahanan fagositosis pada tikus putih ketika ada respon inflamasi dalam tubuh (Rowland, 2010).

Pada saat terjadi proses inflamasi, arteriol akan dilatasi, aliran darah ke daerah radang bertambah yang diikuti dengan meningkatnya viskositas darah. Ketika viskositas darah naik dan alirannya melambat maka leukosit-leukosit mulai mengalami marginasi, yaitu bergerak ke tepi pembuluh darah kemudian mulai melekat pada endotel dan dilanjutkan emigrasi leukosit dari pembuluh darah ke

jaringan sekitarnya (Price & Wilson, 2006). Radang akut merupakan respon tubuh terhadap rangsangan yang merusak dan diselesaikan oleh pergerakan plasma dan leukosit dari vaskuler ke jaringan yang rusak. Proses peradangan akut ini diinisiasi oleh darah yang menuju tempat terjadinya luka, yang memindahkan protein plasma dan leukosit-leukosit dalam jaringan peningkatan aliran cairan yang menuju jaringan yang akan menyebabkan bengkak dan diikuti inflamasi (Price & Wilson, 2006).

Mediator inflamasi seperti leukosit (limfosit, dan eosinofil) serta sel plasma akan tampak perbedaan jumlah yang bermakna pada kondisi inflamasi (Prucha, 2015). Pada proses inflamasi fase awal yaitu dalam 24 jam pertama sel yang paling banyak bereaksi adalah sel neutrofil atau leukosit polimorfonuklear (PMN). Sesudah fase awal yang bisa berlangsung sampai 48 jam mulailah disusul oleh aktivasi makrofag. Sesudah makrofag akan muncul limfosit T dengan jumlah yang bermakna pada hari ke-5 dan mencapai puncak pada hari ke 7 (Prucha, 2015).

Penelitian ini menunjukkan bahwa hasil hitung sel darah putih (leukosit) pada kelompok yang diberikan probiotik selama 14 hari dan diinduksi LPS *E. coli* pada hari ke-15 menunjukkan adanya peningkatan jumlah sel darah putih (leukosit), yaitu ( $26.53 \pm 1.77$ ). Peningkatan jumlah sel darah putih (leukosit) ini diakibatkan oleh induksi LPS *E. coli* sebagai model infeksi sepsis. Hasil analisis statistik menunjukkan adanya perbedaan yang bermakna ( $p < 0,05$ ) diantara kelompok P2 dengan P1 (0,019) dan P0 (0,000). Hasil hitung sel darah putih setiap kelompok menunjukkan adanya perbedaan yang bermakna ( $p < 0,05$ ).

Seperti penelitian yang telah dilakukan oleh Fahrimal (2014) bahwa kelompok yang diinfeksi *T. evansi* mampu meningkatkan jumlah leukosit,

sedangkan kelompok yang diberikan suplemen tambahan seperti probiotik secara berkala mampu mengembalikan profil darah tikus mendekati nilai normal. Pemberian probiotik akan merangsang peningkatan jumlah leukosit untuk meningkatkan sistem imunitas seluler dalam tubuh, sehingga ketika tubuh diinduksi LPS *E. coli*, probiotik mampu menghambat adhesi patogen dalam sel endotel tubuh (Satoru, 2013).

Penelitian yang dilakukan oleh Astawan (2011) menunjukkan adanya peningkatan jumlah sel darah putih atau leukosit pada kelompok tikus yang diberi probiotik, baik kelompok *L. plantarum* 2C12, maupun *L. Acidophilus* 2B4 disebabkan probiotik mampu bertindak sebagai immunomodulator. Beberapa strain bakteri asam laktat yang bersifat probiotik menstimulasi sistem imun, seperti memperbaiki aktivitas makrofag, meningkatkan antibodi, mengaktifkan sel *natural killer* (NK). Bakteri asam laktat probiotik dapat mempengaruhi fungsi dari sel darah putih sehingga mampu meningkatkan respon imun, baik spesifik maupun non-spesifik, serta mampu mengendalikan infeksi saluran usus (Perdigon et al., 2001; Bhatia & Rani, 2008).

Hasil hitung sel darah putih (leukosit) pada kelompok P2 didapatkan jumlah sel leukosit lebih rendah jika dibandingkan dengan kelompok P1. Hal ini kemungkinan dikarenakan oleh pemberian profilaksis probiotik (*Lactobacillus* spp) selama 14 hari yang mampu mensupresi respon inflamasi, sehingga pada kelompok P2 hasil hitung sel darah putih menunjukkan rerata lebih rendah daripada kelompok P1 yang hanya diinduksi oleh LPS *E.coli*.

Berdasarkan hasil penelitian ini dapat diketahui pengaruh probiotik yaitu mampu meningkatkan jumlah sel leukosit tikus wistar jantan yang sebelumnya telah diinduksi LPS *E. coli*. Pemberian probiotik *Lactobacillus* spp selama 14 hari

kemudian dilanjutkan dengan pemberian LPS *E. coli* secara oral selama 24 jam terbukti memiliki pengaruh yang signifikan terhadap hitung sel darah putih pada tikus putih model sepsis.

#### 6.4. Analisis Jumlah Sel Darah Putih Setiap Kelompok

Berdasarkan hasil uji lanjut Post-hoc, menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan antar ketiga kelompok penelitian. Dari analisis statistik diketahui bahwa terdapat perbedaan bermakna ( $p < 0.05$ ) antara kelompok P2 dengan P1 ( $p = 0.019$ ), kelompok P2 dengan P0 ( $p = 0.000$ ), dan P0 dengan P1 ( $p = 0.000$ ). Rerata nilai sel darah putih pada kelompok P1 dan P2 sama-sama mengalami peningkatan nilai sel darah putih. Hal ini dipengaruhi oleh adanya respon inflamasi dalam tubuh tikus putih selama 24 jam.

Respon inflamasi yang muncul disebabkan oleh adanya induksi LPS *E.coli* pada kedua kelompok tersebut. Hasil uji lanjut Post-hoc menunjukkan antara kelompok tikus putih yang diinduksi LPS *E.coli* dengan kelompok tikus putih yang diberi probiotik *Lactobacillus spp* kemudian diinduksi LPS *E.coli* menunjukkan adanya perbedaan yang bermakna. Kelompok tikus putih yang diberi probiotik *Lactobacillus spp* memiliki rerata nilai sel darah putih yang lebih rendah daripada kelompok tikus putih yang diinduksi LPS *E.coli*.

Hal ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Astawan (2010) bahwa adanya peningkatan jumlah leukosit (sel darah putih) pada kelompok tikus yang diberi probiotik, baik *L. plantarum* 2C12, maupun *L. Acidophilus* 2B4 disebabkan probiotik mampu bertindak sebagai immunomodulator. Dijelaskan lebih lanjut bahwa probiotik mampu menguatkan sel darah putih sebagai sistem imunitas seluler, sehingga dapat meningkatkan pertahanan fagositosis ketika ada

respon inflamasi dalam tubuh tikus putih (Rowland, 2010). Probiotik *Lactobacillus spp* pada tikus putih sebagai profilaksis mampu menekan aktifitas respon inflamasi agar tidak meluas menjadi sepsis. Respon inflamasi yang terjadi pada kelompok tikus putih dengan pemberian probiotik dan induksi LPS *E.coli* akan bersifat lokal dan mampu ditahan oleh sistem imunitas seluler yang telah dikuatkan oleh probiotik.

Beberapa strain bakteri asam laktat yang bersifat probiotik menstimulasi sistem imun, seperti memperbaiki aktivitas makrofag, meningkatkan antibodi, mengaktifkan sel natural killer, dan mempengaruhi proliferasi sel darah putih intraepitel. Bakteri asam laktat probiotik dapat meningkatkan respon imun, baik spesifik maupun nonspesifik, serta mampu mengendalikan respon inflamasi agar tidak meluas dan bersifat sistemik (Bhatia & Rani, 2008).

#### **6.5. Implikasi terhadap Bidang Keperawatan**

Pemanfaatan probiotik *Lactobacillus spp* sebagai upaya meningkatkan imunitas tubuh dalam mencegah kondisi inflamasi masih jarang digunakan di masyarakat. Berdasarkan analisis data, terdapat perbedaan yang bermakna antara setiap kelompok hewan coba terhadap hasil hitung sel darah putih. Pada kelompok tikus yang diberi probiotik selama 14 hari dan diinduksi LPS *E. coli* pada hari ke-15 menunjukkan adanya perbedaan bermakna dengan hasil hitung sel darah putih pada kelompok yang diinduksi LPS *E. coli* pada hari ke-15, walaupun secara teori hasil hitung pada kelompok P2 masih menunjukkan adanya peningkatan jumlah sel darah putih yang berarti terjadi kondisi sepsis. Hal ini dapat menjadi pertimbangan agar dilakukan monitoring jumlah sel darah

putih dalam pemberian probiotik berkelanjutan sebagai upaya mencegah kondisi sepsis.

#### 6.6. Keterbatasan Penelitian

Hasil uji One-way ANOVA menunjukkan adanya perbedaan pengaruh yang signifikan antara jumlah sel darah putih pada setiap kelompok tikus putih. Keterbatasan dalam penelitian ini yaitu, laboratorium Parasitologi sebagai tempat dirawatnya tikus selama  $\pm 23$  hari masih belum *pirogen free*. Sehingga, peneliti tidak bisa memastikan adanya faktor-faktor lain yang dapat memengaruhi hasil penelitian. Selain itu, peneliti hanya menggunakan satu dosis saja selama pemberian probiotik *Lactobacillus spp.* Sehingga tidak bisa diketahui rentang dosis probiotik yang efektif sebagai profilaksis dalam upaya mencegah terjadinya kondisi sepsis.

