

Hitung Jenis Leukosit Hapusan Darah Tikus Model Sepsis dengan Infeksi *Escherichia coli* ESBL dan *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase

*(DIFFERENTIAL COUNT IN RAT BLOOD SMEAR SEPSIS
MODEL WITH ESCHERICHIA COLI ESBL AND KLEBSIELLA
PNEUMONIAE CARBAPENEMASE INFECTION)*

Lisa Savitri, Syntia Tanu Juwita

Program Studi Teknologi Laboratorium Medis,
Fakultas Ilmu Kesehatan, Universitas Kadiri,
Jalan Selomangleng No. 1 Kediri,
Jawa Timur Indonesia 64115
Email: lisasavitri@unik-kediri.ac.id

ABSTRACT

Sepsis is an irregular body response to severe infection, triggering uncontrolled inflammation that can lead to extensive tissue damage. It can progress to septic shock with multiple organ failure, resulting in death if left untreated. Laboratory examinations, such as leukocyte differential count in hematology, help understand the distribution pattern of white blood cells associated with health conditions. Laboratory research was conducted on mice injected with *E. coli* ESBL or *K. pneumoniae* carbapenemase. After 24 hours, observations were made on apoptosis in the spleen and liver of rats. Rat blood was processed to count white blood cell types with a differential count. The results were analyzed to compare the control group with the bacterial infection groups of *E. coli* ESBL and *K. pneumoniae* carbapenemase. The research results indicate that the neutrophil count in the *E. coli* ESBL group is still within the normal range and lower ($44.5 \pm 1.915\%$) compared to the *K. pneumoniae* carbapenemase group ($55.75 \pm 8.342\%$). Similarly, the lymphocyte count in the *E. coli* ESBL group is within the normal range and lower ($77.5 \pm 3.109\%$) compared to the *K. pneumoniae* carbapenemase group ($91.25 \pm 7.588\%$). This highlights the crucial role of neutrophils and lymphocytes in responding to severe bacterial infections such as *K. pneumoniae* carbapenemase. Previous studies indicate neutrophilia and lymphocytopenia as markers of severe bacterial infections. Neutrophils are the primary defense against bacterial infections and can be rapidly recruited to the infection site, while specific infections can trigger prolonged neutrophil recruitment from hematopoietic tissues.

Keywords: differential count; sepsis; *Escherichia coli* ESBL; *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase

ABSTRAK

Sepsis adalah respons tubuh yang tidak teratur terhadap infeksi parah, memicu peradangan tak terkendali dan dapat menyebabkan cedera luas pada jaringan. Hal ini dapat berkembang menjadi syok septik dengan kegagalan berbagai fungsi organa, menyebabkan kematian jika tidak diobati. Pemeriksaan laboratorium, seperti hitung jenis leukosit dalam hematologi, membantu memahami pola distribusi sel darah putih yang berkaitan dengan kondisi kesehatan. Penelitian laboratorium dilakukan pada tikus yang diinjeksi dengan *E. coli* ESBL atau *K. pneumoniae* carbapenemase. Setelah 24 jam, dilakukan pengamatan terhadap apoptosis pada limpa dan hati tikus. Darah tikus diproses untuk menghitung jenis sel darah putih dengan *differential count*. Hasilnya dianalisis untuk membandingkan kelompok kontrol dengan kelompok yang diinfeksi bakteri *E. coli* ESBL dan *K. pneumoniae* carbapenemase. Hasil penelitian menunjukkan bahwa jumlah neutrofil pada kelompok yang diinfeksi *E. coli* ESBL masih dalam rerata normal dan lebih rendah ($44,5 \pm 1,915\%$) dibandingkan dengan kelompok *K. pneumoniae* carbapenemase ($55,75 \pm 8,342\%$). Begitu pula halnya dengan jumlah limfosit, kelompok yang diinfeksi *E. coli* ESBL memiliki nilai yang normal dan lebih rendah ($77,5 \pm 3,109\%$) jika dibandingkan dengan kelompok yang diinfeksi *K. pneumoniae* carbapenemase ($91,25 \pm 7,588\%$). Hal ini menyoroti peran penting neutrofil dan limfosit dalam respons terhadap infeksi bakteri berat seperti *K. pneumoniae* carbapenemase. Studi sebelumnya menunjukkan neutrofilia dan limfositopenia sebagai penanda infeksi bakteri yang parah. Neutrofil adalah garis pertahanan utama melawan infeksi bakteri dan dapat direkrut dengan cepat ke lokasi infeksi, sementara infeksi tertentu dapat memicu rekrutmen neutrofil jangka panjang dari jaringan hematopoietik.

Kata-kata kunci: *differential count*; sepsis; *Escherichia coli* ESBL; *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase

PENDAHULUAN

Sepsis adalah sindrom klinis yang disebabkan oleh respons tubuh yang tidak teratur terhadap infeksi yang parah (Weiss *et al.*, 2020; Fleischmann *et al.*, 2018; Rudd *et al.*, 2020). Peradangan intravaskuler yang tidak terkontrol, tidak teratur, dan mandiri ini dapat menyebabkan disfungsi organ dalam jaringan yang jauh dari insiden asli, berkembang dengan cepat menjadi syok septik dengan kegagalan organ ganda terkait (Weiss *et al.*, 2020; Cinel *et al.*, 2007).

Jika tidak diobati dengan tepat waktu, kematian dapat terjadi baik sebagai syok refraktori, yang bertanggung jawab atas sepertiga kematian dalam 72 jam pertama, atau sebagai sindrom disfungsi organ ganda (*Multi Organ Distress Syndrome*), dengan kegagalan pernapasan dan kegagalan neurologis yang dominan sebagai penyebab utama kematian (Workman *et al.*, 2016). Pemeriksaan laboratorium merupakan prosedur diagnostik yang dilakukan dalam konteks

klinik (Nam *et al.*, 2022). Tujuan dari hitung jenis leukosit (*differential count* atau disingkat dengan *diffcount*) adalah untuk memberikan pola distribusi normal jenis-jenis sel pada individu yang sehat. Seperti telah dilaporkan terdapat pola distribusi yang terkait dengan penyakit pada hitung jenis sel leukosit (Evren *et al.*, 2023).

METODE PENELITIAN

Penelitian ini adalah penelitian murni laboratorium (*true experimental*) dengan menggunakan rancangan penelitian *post test only control group design* (pengambilan data dilakukan sesudah diberikan perlakuan) dan dibandingkan dengan kelompok kontrol. Lokasi penelitian ini dilakukan di Unit Hewan Coba Laboratorium Ilmu Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga, Jalan Mayjen Prof. Dr. Moestopo 47 Surabaya dan Laboratorium Mikrobiologi RSUD dr. Soetomo Surabaya sebagai tempat

mengkultur isolat klinis (*wild type*) *E. coli* ESBL dan *K. pneumoniae* carba-penemase dengan dosis 1×10^5 CFU/mL.

Objek Penelitian

Objek penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah tikus (*Rattus norvegicus*) jantan strain Wistar berumur sekitar 8-12 minggu dengan bobot badan 150-200 g yang berasal dari Unit Hewan Coba Laboratorium Ilmu Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga, Jalan Mayjen Prof. Dr. Moestopo 47 Surabaya. Jumlah tikus pada penelitian ini adalah 12 ekor tikus dengan tiga macam perlakuan.

Perlakuan pada Hewan Coba

Tikus yang telah diadaptasikan diinjeksi pada bagian peritoniumnya dengan perlakuan sebagai berikut: 1) kelompok 1 sebagai kontrol normal, yaitu tikus diinjeksi aqua pro *injection* bebas pirogen, 2) kelompok 2 sebagai perlakuan 1, yaitu tikus diinjeksi *E. coli* ESBL dengan dosis 1×10^5 CFU/mL, dan 3) kelompok 3 sebagai perlakuan 2, yaitu tikus diinjeksi *K. pneumoniae* carbapenemase dengan dosis 1×10^5 CFU/mL.

Pemrosesan Darah

Prosedur untuk melakukan *diffcount* melibatkan langkah-langkah spesifik dalam menghitung persentase dan jumlah sel darah yang berbeda dalam sampel darah. Pertama, persiapkan sampel darah yang telah diambil dan siapkan larutan pengenceran jika diperlukan. Kemudian, teteskan sampel darah ke dalam kisi hitung menggunakan pipet atau teknik yang sesuai. Selanjutnya, hitung jumlah sel darah merah dan sel darah putih dalam beberapa bidang pandang di bawah mikroskop cahaya dengan perbesaran yang tepat.

Untuk melakukan *diffcount*, identifikasi dan hitunglah jumlah sel darah putih dari jenis yang berbeda seperti neutrofil, limfosit, eosinofil, basofil, dan monosit. Hitung persentase relatif dari masing-masing jenis sel darah putih dengan menghitung jumlahnya dalam beberapa bidang pandang

dan mem-baginya dengan total sel darah putih yang dihitung. Terakhir, melaporkan hasil *diff-count* dengan menyatakan persentase relatif dari setiap jenis sel darah putih yang dihitung dalam sampel.

Analisis Data

Hasil yang diperoleh dianalisis dengan cara menghitung ukuran pemusatan (mean, median, dan modus) dan pencaran (standar deviasi dan koefisien variasi). Data dianalisis dengan menggunakan aplikasi Graphad Prism 9.

HASIL DAN PEMBAHASAN

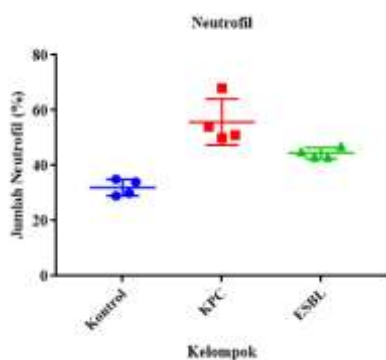
Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, didapatkan hasil bahwa nilai neutrofil dan limfosit tikus yang terinfeksi *E. coli* ESBL (Gambar 1) lebih rendah daripada tikus dengan infeksi *K. pneumoniae* carbapenemase (Gambar 2) yang diambil dari darah tepi pada saat tikus mati (baik tikus yang mati kurang dari 24 jam ataupun tikus yang mati pada saat 24 jam). Data rerata dan simpangan baku *diffcount* pada tikus kelompok kontrol, tikus dengan infeksi *E. coli* ESBL, dan tikus dengan infeksi *K. pneumoniae* carbapenemase disajikan pada Tabel 1.

Tabel 1. Data Rerata *Diffcount* Tikus Terinfeksi *Escherichia coli* ESBL atau *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (%)

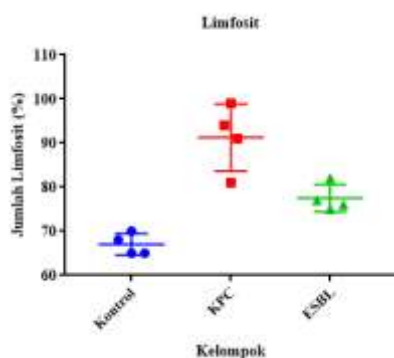
Kelompok	Neutrofil	Limfosit
Kontrol (n=4)	32,0±2,944	67,0±2,449
<i>E. coli</i> ESBL (n=4)	44,5±1,915	77,5±3,109
<i>K. pneumoniae</i> carbapenemase (n=4)	55,75±8,342	91,25±7,588

Berdasarkan data rerata pada Tabel 1, dapat diketahui bahwa jumlah neutrofil pada kelompok perlakuan infeksi *E. coli* ESBL masih berada dalam rerata normal dan memiliki nilai yang lebih rendah daripada neutrofil pada kelompok perlakuan infeksi *K.*

pneumoniae carbapenemase, yaitu sebesar $44,5 \pm 1,915\%$, sedangkan jumlah neutrofil pada *K. pneumoniae* carbapenemase adalah sebesar $55,75 \pm 8,342\%$. Jumlah limfosit pada tikus kelompok perlakuan *E. coli* ESBL juga memiliki nilai yang masih berada dalam rerata normal dan lebih rendah daripada jumlah limfosit tikus pada kelompok perlakuan *K. pneumoniae* carbapenemase, yaitu sebesar $77,5 \pm 3,109\%$, sedangkan limfosit pada *K. pneumoniae* carbapenemase sebesar $91,25 \pm 7,588\%$. Perbedaan antara perlakuan dengan kontrol berdasarkan jumlah netrofil dapat dilihat pada Gambar 1, sedangkan perbedaan antara perlakuan dengan dengan kontrol berdasarkan jumlah limfosit disajikan pada Gambar 2.



Gambar 1. Rerata dan simpangan baku jumlah neutrofil



Gambar 2. Rerata dan Simpangan Baku Jumlah Limfosit

Keterangan:

- = Jumlah limfosit pada kelompok tikus kontrol
- = Jumlah limfosit pada kelompok tikus yang diinfeksi *K. pneumoniae* carbapenemase
- = Jumlah limfosit pada kelompok tikus yang diinfeksi *E. coli* ESBL

Kelompok bakteri *E. coli* ESBL

memiliki jumlah neutrofil dan limfosit yang masih dalam rerata normal. Namun, lebih rendah daripada kelompok tikus perlakuan infeksi bakteri *K. pneumoniae* carbapenemase. Neutrofil dan limfosit merupakan komponen penting dalam respons imun terhadap infeksi. (Luiz dan Jose, 2005). Limfosit yang merupakan 20% dari semua leukosit dalam sirkulasi darah orang dewasa terdiri atas limfosit T dan limfosit B, yang merupakan pengontrol sistem imun (Gun-tur, 2008). Proses patologi yang utama pada sepsis adalah apoptosis dari sel-sel efektor imun, termasuk limfosit (Chang *et al.*, 2007). Sementara itu Zahorec *et al.* (2001) telah mendokumentasikan *neutrophil to lymphocyte count ratio* (NLCR) sebagai parameter yang mudah diukur untuk menunjukkan tingkat keparahan peradangan sistemik dan sepsis. Bahkan, NLCR adalah parameter yang berguna untuk menduga terjadinya bakteremia pada pengaturan perawatan darurat (Tumbarello *et al.*, 2007). Namun, ada kekurangan informasi tentang potensi penggunaan NLCR untuk melakukan pembedaan antara infeksi bakteri yang parah/berat dari infeksi virus (Furze *et al.*, 2008).

Kelompok bakteri *E. coli* ESBL menunjukkan jumlah neutrofil dan limfosit yang berada dalam rerata normal, namun lebih rendah dibandingkan dengan kelompok bakteri *K. pneumoniae* carbapenemase. Jumlah neutrofil pada kelompok *E. coli* ESBL sebesar $44,5 \pm 1,915\%$, sedangkan pada *K. pneumoniae* carbapenemase sebesar $55,75 \pm 8,342\%$. Demikian pula, jumlah limfosit pada kelompok *E. coli* ESBL adalah $77,5 \pm 3,109\%$, sedangkan pada *K. pneumoniae* carbapenemase mencapai $91,25 \pm 7,588\%$. Perbedaan ini dalam respons imun terhadap infeksi dapat memengaruhi dinamika kesehatan, meskipun penelitian ini belum memberikan informasi tentang kemampuan rasio neutrofil terhadap limfosit dalam membedakan keparahan infeksi bakteri parah. Meskipun demikian, temuan ini menyoroti peran utama neutrofil sebagai garis pertahanan pertama dan potensi rekrutmen jangka panjang dari jaringan hematopoietik dalam kondisi tertentu.

SIMPULAN

Neutrofil dan limfosit berperan penting dalam merespons infeksi bakteri parah (*K. pneumoniae* carbapenemase). Neutrofil adalah garis pertahanan utama melawan infeksi bakteri dan dapat direkrut dengan cepat ke lokasi infeksi, sementara infeksi tertentu dapat memicu rekrutmen neutrofil jangka panjang dari jaringan hematopoietik.

SARAN

Penelitian lebih lanjut diperlukan untuk memahami secara lebih mendalam implikasi klinis dari perbedaan respons sel darah putih (neutrofil dan limfosit) ini dan sejauh mana hal ini dapat memengaruhi prognosis dan penanganan infeksi bakteri yang parah.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terimakasih ditujukan kepada Unit Hewan Coba Laboratorium Ilmu Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga, Jalan Mayjen Prof. Dr. Moestopo 47 Surabaya dan Laboratorium Mikrobiologi RSUD dr. Soetomo, Gubeng, Surabaya yang telah menyediakan tempat pelaksanaan penelitian. Selain itu juga kepada Lembaga Penelitian, Pengembangan, dan Pengabdian Masyarakat (LP3M) Universitas Kediri (Unik), Mojoroto, Kediri, Jawa Timur yang selalu memberikan dukungan dalam pelaksanaan penelitian

DAFTAR PUSTAKA

- Chang KC., Unsinger J, Davis CG, Schwulst SJ, Muenzer JT, Strasser A, Hotchkiss RS. 2007. Multiple triggers of cell death in sepsis: death receptor and mitochondrialmediated apoptosis. *Federation of American Societies for Experimental Biology Journal* 21: 708-719.
- Cinel I, Dellinger RP. 2007. Advances in Pathogenesis and management of Sepsis. *Curr Opin Infect. Dis* 20(4): 345-352.
- Evren E, Us E, Hekimoğlu CH, Ceren Karahan Z. 2023. Cell counting chamber vs. Sysmex XN-1000 for determining white blood cell count and differentiation for body fluids. *Turkish J Biochem* 48(1): 19-25.
- Fleischmann-Struzek C, Goldfarb DM, Schlattmann P, Schlapbach LJ, Reinhart K, Kissoon N. 2018. The global burden of paediatric and neonatal sepsis: a systematic review. *Lancet Respir Med* 6(3):223-230. [https://doi.org/10.1016/S2213-2600\(18\)30063-8](https://doi.org/10.1016/S2213-2600(18)30063-8).
- Furze RC, Rankin SM. 2008. Neutrophil mobilization and clearance in the bone marrow. *Immunology* 125: 281–288.
- Nam M, Yoon S, Hur M. 2022. Digital Morphology Analyzer Sysmex DI-60 vs. Manual Counting for White Blood Cell Differentials in Leukopenic Samples: A Comparative Assessment of Risk and Turnaround Time. *Ann Lab Med* 42(4): 398-405.
- Rudd KE, Johnson SC, Agesa KM, Shackelford KA, Tsoi D, Kievlan DR. 2020. Global, regional, and national sepsis incidence and mortality, 1990–2017: analysis for the Global Burden of Disease Study. *Lancet* 395(10219): 200-211. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(19\)32989-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(19)32989-7).
- Tumbarello M, Sanguinetti M, Montuori E, Trecarichi EM, Posteraro B, Fiori B, Citton R, D'Inzeo T, Fadda G, Cauda R, Spanu T. 2007. Predictors of mortality in patients with bloodstream infections caused by extended-spectrum-beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae: importance of inadequate initial antimicrobial treatment. *Anti-microbial*

- Agents and Chemotherapy* 51(6): 1987–1994. Epub 2007/03/28. doi: 10.1128/aac.01509-06
- Weiss SL, Peters MJ, Alhazzani W, Agus MSD, Flori HR, Inwald DP, Nadel S, Schlapbach LJ, Tasker RC, Argent AC, Brierley J, Carcillo J, Carroll ED, Carroll CL, Cheifetz IM, Chong K, Cies JJ, Cruz AT, De Luca D, Deep A, Faust SN, De Oliveira CF, Hall MW, Ishimine P, Javouhey E, Joosten KFM, Joshi P, Karam O, Kneyber MCJ, Lemson J, Mac Laren G, Mehta NM, Møller MH, Newth CJL, Nguyen TC, Nishisaki A, Nunnally ME, Parker MM, Paul RM, Randolph AG, Ranjit S, Romer LH, Scott HF, Tume LN, Verger JT, Williams EA, Wolf J, Wong HR, Zimmerman JJ, Kisson N, Tissieres P. 2020. Surviving sepsis campaign international guidelines for the management of septic shock and sepsis-associated organ dysfunction in children. *Pediatr Crit Care Med* 21(2):e52–106. <https://doi.org/10.1097/PCC.0000000000002198>.
- Workman JK, Ames SG, Reeder RW, Korgenski EK, Masotti SM, Bratton SL, Larsen GY. 2016. Treatment of pediatric septic shock with the surviving sepsis campaign guidelines and PICU patient outcomes. *Pediatr Crit Care Med* 17(10):e451–458. <https://doi.org/10.1097/PCC.0000000000000906>.
- Zahorec R. 2001. Ratio of neutrophil to Lymphocyte counts-rapid and simple parameter of systemic inflammation and stress in critically ill *Bratisl Med J* 102: 5-14