

Hubungan antara Patogen Usus dengan Kadar Laktoferin Tinja pada Anak dengan Diare Akut

Daisy Manalip, Sarah M. Warouw, Jeanette I. Ch. Manoppo

Bagian Ilmu Kesehatan Anak, Fakultas Kedokteran Universitas Sam Ratulangi/ RSUP Prof. Dr. R.D. Kandou, Manado

Latar belakang. Para dokter sering mengalami kesulitan membedakan diare akut yang disebabkan oleh bakteri maupun non-bakteri. Kadar laktoferin (LF) tinja merupakan petanda migrasi neutrofil dalam lumen usus dan dihubungkan dengan inflamasi usus.

Tujuan. Mengetahui hubungan antara patogen usus dengan kadar LF tinja pada anak dengan diare akut

Metode. Penelitian analitik observasional dengan pendekatan potong lintang dilakukan di dua rumah sakit umum kota Manado selama bulan Juli hingga November 2013. Pengambilan sampel dilakukan secara konsekutif pada anak berusia 7-60 bulan yang menderita diare akut. Hasil dianalisis secara deskriptif untuk data karakteristik anak dan data laboratorium, serta analisis regresi dan korelasi linier sederhana. Data diolah menggunakan program SPSS versi 21, dengan tingkat kemaknaan $p < 0,05$.

Hasil. Total sampel yang didapatkan 43 pasien diare akut, terdiri atas 25 laki-laki dan 18 perempuan. Kadar LF tinja yang disebabkan oleh patogen usus bakteri didapatkan rerata 9,65 (SB 3,69) $\mu\text{g/g}$. Sementara kadar LF tinja yang disebabkan oleh patogen usus non bakteri didapatkan rerata 3,72 (SB 1,48) $\mu\text{g/g}$. Terdapat perbedaan bermakna rerata LF tinja pada kedua kelompok patogen usus ($p < 0,001$, $r = 0,591$).

Kesimpulan. Adanya hubungan yang bermakna antara patogen usus dengan kadar laktoferin tinja pada anak dengan diare akut. Patogen usus golongan bakteri memiliki kadar laktoferin tinja yang lebih tinggi daripada patogen usus golongan non bakteri.

Sari Pediatri 2015;17(2):124-8.

Kata kunci : laktoferin tinja, diare akut, patogen usus

Correlation between Gut Pathogens and Fecal Lactoferrin Levels in Children with Acute Diarrhea

Daisy Manalip, Sarah M. Warouw, Jeanette I. Ch. Manoppo

Background Doctors often have difficulty in differentiating acute diarrhea caused by bacteria or non-bacteria. Faecal lactoferrin (LF) level is a marker of the neutrophil migration into the intestinal lumen and is associated with intestinal inflammation.

Objective. To determine the correlation between gut pathogens and faecal lactoferrin level in children with acute diarrhea.

Methods. We conducted an analytic observational study with cross sectional design in two general hospitals in Manado from July 2013 until November 2013. Samples were obtained consecutively from children aged 7-60 months suffering from acute diarrhea. The results were analyzed descriptively for children's clinical and laboratory characteristics. A logistic regression analysis was applied to see the above mentioned correlation, using SPSS version 21, with level of significance $p < 0.05$.

Results. Forty three patients with acute diarrhea were enrolled into the study, comprising of 25 boys and 18 girls. The mean of faecal lactoferrin in children with bacterial acute diarrhea was 9.65 (SD 3.69) $\mu\text{g/g}$, and that of non bacterial acute diarrhea was 3.72 (SD 1.48) $\mu\text{g/g}$. The mean levels of faecal lactoferrin in both groups of gut pathogens were significantly different with ($p < 0.001$, $r = 0.591$).

Sari Pediatri 2015;17(2):124-8.

Keywords: faecal lactoferrin, acute diarrhea, gut pathogens

Alamat korespondensi: Dr. Daisy Manalip, Sp.A. BIKAFK Universitas Sam Ratulangi/ RSUP Prof. Dr. R.D. Kandou, Manado. Jl. Raya Tanawangko Malalayang. Telp. +62431-821652. E-mail: daisy_manalip@idai.or.id

Diare merupakan salah satu masalah kesehatan masyarakat yang terpenting karena merupakan penyebab utama morbiditas dan mortalitas anak di negara yang sedang berkembang.^{1,2} Untuk menghindari penyalahgunaan terapi antibiotik pada penderita diare akut, identifikasi awal penyebab diare akut sangat penting. Para dokter sering mengalami kesulitan dalam membedakan diare akut yang disebabkan oleh bakteri maupun non-bakteri.³

Baku emas untuk mendiagnosis diare akut yang infeksius adalah kultur tinja, tetapi pemeriksaan ini memerlukan waktu yang lama sehingga terjadi keterlambatan terapi definitif, dan sangat rendah tingkat kultur positif.³⁻⁶ Dalam mendiagnosis diare akut infeksius dibutuhkan biomarker yang cepat dan akurat.^{3,6,7} Kadar laktoferin dapat diukur pada tinja karena berhubungan dengan inflamasi usus.⁸ Bakteri invasif pada saluran pencernaan sering menyebabkan inflamasi usus, sebaliknya virus, parasit, dan penyebab diare *toxin-mediated* jarang menyebabkan inflamasi. Oleh karena itu, identifikasi produk-produk inflamasi usus pada tinja dapat dipakai untuk menentukan terapi diare, utamanya pemberian antibiotik.³ Chen dkk⁹ melaporkan kadar laktoferin tinja yang lebih tinggi pada diare akut yang disebabkan oleh patogen usus golongan bakteri dibandingkan dengan diare akut karena penyebab yang lain. Tujuan penelitian ini untuk mengetahui hubungan antara patogen usus dan kadar laktoferin tinja pada anak dengan diare akut.

Metode

Penelitian analitik observasional dengan pendekatan potong lintang pada semua kasus diare akut yang dirawat di Bagian Ilmu Kesehatan Anak RSUP Prof. Dr. R.D. Kandou dan RS Pancaran Kasih mulai bulan Juli sampai dengan November 2013. Kriteria inklusi adalah usia pasien 7-60 bulan yang didiagnosis sebagai diare akut dan telah mendapat persetujuan orangtua. Kriteria eksklusi adalah perdarahan saluran cerna, pemberian ASI, antibiotik atau anti-inflamasi, gizi buruk serta imunodefisiensi. Pengambilan sampel dilakukan secara konsekutif. Besar sampel yang dibutuhkan minimal 38 sampel ($\alpha=0,05$; $\beta=0,80$; $r=0,40$).

Patogen usus penyebab diare dibagi atas golongan bakteri dan non bakteri. Golongan bakteri yaitu bila pada pemeriksaan mikroskopik tinja didapatkan

leukosit dalam tinja ≥ 1 sel/Lapangan Pandang Besar (LPB). Sebaliknya, golongan non bakteri yaitu apabila pada pemeriksaan mikroskopis tinja tidak didapatkan leukosit dalam tinja.^{3,6,10-12} Laktoferin tinja diukur dengan metode ELISA. Kultur tinja dilakukan dengan menggunakan media MacConkey. Status gizi ditentukan berdasarkan perhitungan berat badan per tinggi badan penderita yang diplot pada baku median Z-score WHO 2007 sesuai umur dan jenis kelamin pasien. Penelitian ini dilaksanakan dengan persetujuan Komite Etik Kesehatan FK Universitas Sam Ratulangi.

Hasil dianalisis deskriptif untuk data karakteristik anak dan data laboratorium, serta analisis regresi dan korelasi linier sederhana (*Pearson*). Data diolah menggunakan program SPSS versi 21, dengan tingkat kemaknaan $p < 0,05$.

Hasil

Total subjek 43 anak, terdiri atas 25 laki-laki dan 18 perempuan. Karakteristik pasien tertera pada Tabel 1.

Tabel 1. Karakteristik subyek penelitian

Variabel	Nilai statistik
Jenis kelamin (%)	
Laki-laki	25(58,14)
Perempuan	18(41,86)
Usia (bulan)	
Rerata	20,84
SB	14,19
Median	16,00
Status gizi (%)	
Lebih	1 (2,33)
Baik	33 (76,74)
Kurang	9 (20,93)
Frekuensi diare (per hari)	
Rerata	5,93
SB	2,51
Median	5,00
Leukosit tinja (%)	
≥ 1 /LPB	34 (79,07)
0/LPB	9 (20,93)
Kultur tinja (%)	
<i>E. coli</i>	16 (37,21)
<i>Candida albicans</i>	1 (2,32)
Tidak tumbuh kuman	26 (60,47)
Parasit (%)	
<i>Ascaris lumbricoides</i>	1 (2,32)
<i>Blastocystis hominis</i>	2 (4,65)

Hasil uji kenormalan data dengan Uji Kolmogorov-Smirnov menyatakan data LF tinja pada kelompok non bakteri dan kelompok bakteri menyebar normal ($p=0,200$) sehingga digunakan uji t tidak berpasangan untuk melihat perbandingan kadar LF tinja pada kedua kelompok. Hasil uji t tidak berpasangan menyatakan bahwa ada perbedaan bermakna rerata kadar LF tinja di antara kedua kelompok patogen usus ($p<0,001$). Rerata LF tinja pada bakteri lebih tinggi daripada non bakteri. Hasil uji tersebut tertera pada Tabel 2.

Berdasarkan hasil analisis regresi dan korelasi linier sederhana terhadap hubungan antara patogen usus dengan kadar laktoferin tinja pada anak dengan diare akut, menyatakan ada hubungan yang bermakna antara kejadian patogen usus dan kadar LF tinja ($p<0,001$) seperti tertera dalam Tabel 3 dan Gambar 1.

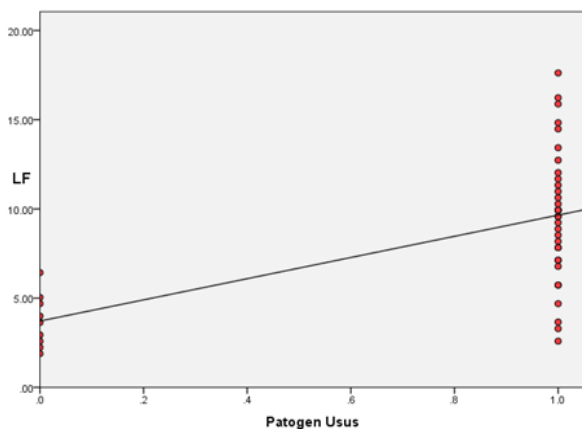
halus, invasi pada lapisan epitel mukosa usus atau menghasilkan suatu enterotoksin.¹³ Pemeriksaan tinja mikroskopik untuk mencari adanya leukosit dapat memberikan informasi tentang penyebab diare, letak anatomis serta adanya proses peradangan mukosa. Leukosit dalam tinja diproduksi sebagai respon terhadap bakteri yang menyerang mukosa kolon. Leukosit yang positif pada pemeriksaan tinja menunjukkan adanya kuman invasif atau kuman yang memproduksi sitotoksin. Pada umumnya, leukosit yang ditemukan adalah PMN, kecuali pada *S.typhi* leukosit mononuklear.¹⁰ Sensitifitas leukosit tinja terhadap inflamasi patogen (*Salmonella*, *Shigella*, dan *Campylobacter*) yang dideteksi dengan kultur tinja bervariasi dari 45% - 95% tergantung dari jenis patogennya.¹⁴ Kami mendapatkan leukosit tinja positif

Tabel 2. Perbandingan kadar laktoferin tinja pada patogen usus

Patogen usus	Rerata ($\mu\text{g/g}$)	SB	t	p
Bakteri	9,65	3,69	-7,40	<0,001
Non bakteri	3,72	1,48		

Tabel 3. Hipotesis hubungan antara patogen usus dengan kadar laktoferin tinja

Model	Koefisien regresi	t	p	r
Konstanta	3,72	3,306	0,002	0,591
Patogen usus	5,94	4,696	0,0001	



Gambar 1. Hubungan patogen usus dan kadar Laktoferin tinja

Pembahasan

Patogenesis diare akut yang disebabkan oleh patogen usus dapat melalui proses perlekatan pada usus

34 (79,07%) dari pemeriksaan dengan menggunakan kadar leukosit tinja ≥ 1 leukosit/LPB. Sesuai dengan penelitian Savola dkk¹⁰ yang melaporkan, dari 797 sampel tinja dengan pemeriksaan leukosit tinja dan 473 sampel dengan kultur tinja, leukosit tinja ≥ 1 /LPB sensitivitas 53% dan spesifisitas 88% untuk 27 kultur tinja yang positif (LR,4.2;95% CI, 2,7 – 6,5; $p<0,001$). Sementara itu, Granville dkk¹¹ melaporkan 25 (32%) pasien dengan gastroenteritis infeksius dengan menggunakan nilai *cutoff* ≥ 1 leukosit/LPB pada pemeriksaan leukosit tinja didapatkan spesifisitas 92% untuk mendeteksi integritas mukosa. Penelitian di Bangladesh melaporkan 98% dari 3558 pasien memperlihatkan inflamasi usus dengan leukosit tinja 1 /LPB.¹²

Sampai sekarang, pemeriksaan yang lebih sensitif leukosit tinja untuk memantau inflamasi usus masih sedikit. Biomarker tinja sangat menarik, aliran tinja berhubungan erat dengan mukosa usus sehingga dapat mengumpulkan molekul-molekul sebagai marker dari inflamasi atau kerusakan mukosa.^{15,16} Laktoferin tinja

merupakan marker tinja non-invasif yang sensitif, lebih murah dibanding biomarker tinja yang lain, cepat, dan mudah dilakukan.^{7,17-19} Laktoferin adalah salah satu marker degranulasi neutrofil yang dapat ditemukan di tinja.^{16,20,21} Sampai saat ini, masih sangat sedikit informasi mengenai konsentrasi LF tinja pada kontrol yang sehat.²²

Pada penelitian terdahulu didapatkan peningkatan kadar LF tinja pada pasien dengan diare akut, terutama diare akut yang disebabkan oleh patogen usus bakterial.^{6,9,17,18} Kami mendapatkan rerata kadar LF tinja pada anak dengan diare akut yang disebabkan oleh patogen usus bakteri 9,65 (SB 3,69) µg/g. Sebaliknya, rerata kadar LF tinja yang disebabkan oleh patogen usus nonbakteri 3,72 (SB 1,48) µg/g. Kami mendapatkan adanya hubungan antar patogen usus dengan kadar laktoferin tinja. Kadar laktoferin tinja pada diare akut yang disebabkan oleh patogen usus bakteri lebih tinggi daripada nonbakteri. Sesuai dengan penelitian Chen dkk⁹ yang menemukan konsentrasi laktoferin tinja penderita dengan infeksi *Salmonella* (11,17 ± 2,73) µg/g, *Campylobacter* (10,32 ± 2,94) µg/g, *rotavirus* (2,82 ± 1,27) µg/g, dan *norovirus* (3,16 ± 1,18) µg/g. Semakin berat aktivitas infeksi semakin tinggi kadar laktoferin tinja. Guerrant dkk⁶ melaporkan peningkatan laktoferin tinja pada 96% (25/26) sampel penderita dengan shigelosis. Guerrant dkk⁶ menyimpulkan bahwa laktoferin tinja dapat digunakan sebagai marker untuk leukosit tinja karena sensitivitasnya yang tinggi. Choi dkk,¹⁷ meneliti 55 sampel tinja dari penderita diare, menemukan 28 sampel dengan infeksi *Salmonella*, *Shigella* atau *Compylobacter*, 93 % terdeteksi dengan peningkatan kadar laktoferin tinja. Mercado dkk²³ melaporkan 95% sampel diare yang disebabkan oleh *diarrheagenic E. coli* ditemukan laktoferin tinja positif.

Diare akut yang disebabkan oleh infeksi patogen usus golongan bakteri dapat menyebabkan peningkatan kadar laktoferin tinja melalui produk dari bakteri tersebut, seperti lipopolisakarida yang merangsang pelepasan kemoatraktan IL-1β dan TNF-α sehingga terjadi migrasi neutrofil (PMN) yang akan melepaskan laktoferin. Migrasi neutrofil dan sekresi protein dari neutrofil akan menyebabkan kerusakan epitel, bahkan kematian sel (apoptosis). Keadaan ini juga akan menyebabkan sekresi laktoferin oleh sel epitel yang rusak dan yang sudah mati sehingga mempertinggi kadar laktoferin tinja. Dengan adanya kerusakan dari epitel usus dan juga apoptosis, akan

menyebabkan fungsi absorpsi berkurang, permeabilitas usus meningkat, dan meningkatkan sekresi Cl⁻ sehingga menyebabkan terjadinya diare. Bakteri Gram negatif yang menyebabkan diare melalui produksi toksin; sitotoksin dapat menghancurkan epitel dan menyebabkan diare inflamasi, sedangkan enterotoksin dapat menyebabkan peningkatan cAMP sehingga menyebabkan terjadinya diare.²⁴

Kelemahan dari penelitian ini adalah infeksi bakteri hanya didasarkan pada leukosit tinja karena fasilitas kultur yang ada hanya terbatas pada patogen usus *E. coli*, *Shigella*, dan *Salmonella*.

Berdasarkan hasil penelitian ini maka dapat disimpulkan terdapat hubungan yang bermakna antara patogen usus dengan kadar laktoferin tinja pada anak dengan diare akut. Patogen usus golongan bakteri memiliki kadar laktoferin tinja yang lebih tinggi daripada patogen usus golongan nonbakteri. Oleh karena itu, laktoferin tinja dapat dipertimbangkan sebagai marker pada diare akut untuk mengetahui penyebab diare sehingga penggunaan antibiotik lebih rasional. Perlu dilakukan penelitian lanjutan dengan ketersediaan media kultur tinja untuk semua bakteri, kultur virus, jamur dan parasit sehingga dapat melihat hubungan kadar laktoferin tinja per patogen usus.

Daftar pustaka

1. Al-Gallas N, Bahri O, Bouratbeen A, Haasen AB, Aissa RB. Etiology of acute diarrhea in children and adults in Tunisia, Tunisia, with emphasis on diarrheagenic *Escherichia coli*: prevalence, phenotyping, and molecular epidemiology. *J Trop Med Hyg* 2007;77:571-82.
2. Podewils LJ, Mintz ED, Nataro JP, Parashar UD. Acute, infectious diarrhea among children in developing countries. *J Spid* 2004;05:155-65.
3. Gill CJ, Lau J, Gorbach SL, Hamer DH. Diagnostic accuracy of stool assays for inflammatory bacterial gastroenteritis in developed and resource-poor countries. *CID* 2003;37:365-75.
4. Santos DRD, Silva LR, Silva N. Antibiotics for the empirical treatment of acute infectious diarrhea in children. *BJID* 2006;10:217-27.
5. Marcus N, Mor M, Amir L, Mimouni M, Waisman Y. The quick-read C-reactive protein test for prediction of bacterial gastroenteritis in the pediatric emergency department. *Pediatr Emerg Care* 2007;23:634-7.
6. Guerrant RL, Araujo V, Soares E, Kotloff K, Lima AAM,

- Cooper WH, dkk. Measurement of fecal lactoferrin as a marker of fecal leukocytes. *J Clin Microbiol* 1992;30:1238-42.
7. Gadewar S, Fasano A. Current concepts in the evaluation, diagnosis and management of acute infectious diarrhea. *Curr Opin Pharmacol* 2005;5:559-65.
 8. D'Inca R, Dal Pont E, Di Leo V, Ferronato, Fries W, Vettorato MG, dkk. Calprotectin and lactoferrin in the assessment of intestinal inflammation and organic disease. *Int J Colorectal Dis* 2007;22:429-37.
 9. Chen CC, Chang CJ, Lin TY, Lai MW, Chao HC, Kong MS. Usefulness of fecal lactoferrin in predicting and monitoring the clinical severity of infectious diarrhea. *WJG* 2011;17:4218-24.
 10. Savola KL, Baron EJ, Tompkins LS, Passaro DJ. Fecal leukocyte stain has diagnostic value for outpatients but not inpatients. *J Clin Microbiol* 2001;39:266-9.
 11. Granville LA, Cernoch P, Land GA, Davis JR. Performance assessment of the fecal leukocyte test for in patients. *J Clin Microbiol* 2004;42:1254-6.
 12. Stoll BJ, Glass RI, Banu H, Hug MI, Khan MU, Ahmed M. Value of stool examination in patients with diarrhoea. *Br Med J* 1983;286:2037-40.
 13. Tormo R, Polanco I, Lindo ES, Goulet O. Acute infectious diarrhoea in children: new insights in antisecretory treatment with racecadotril. *Acta Paediatr* 2008;97:1008-15.
 14. Lung E. Acute Diarrheal disease. Dalam: Friedman SL, McQuaid KR, Grendell JH, editors. *Current diagnosis and treatment in gastroenterology*. Edisi ke-2. New York: Lange Medical Books; 2003.h.131-50.
 15. Vermoir S, Van Ascsche G, Rutgeerts P. Laboratory markers in IBD: useful, magic, or unnecessary toys? *Gut* 2006;55:426-31.
 16. Foel D, Wittkowski H, Roth J. Monitoring disease activity by stool analyses: from occult blood to molecular markers of intestinal inflammation and damage. *Gut* 2009;58:859-68.
 17. Choi SW, Park CH, Silva TM, Zaenker EI, Guerrant RL. To culture or not to culture: fecal lactoferrin screening for inflammatory bacterial diarrhea. *J Clin Microbiol* 1996;34:928-32.
 18. Venkataraman S, Ramakhrisna BS, Kang G, Rajan DP, Mathan VI. Faecal lactoferrin as a predictor of positive faecal culture in south Indian children with acute diarrhoea. *Ann Trop Paediatr* 2003;23:9-13.
 19. Levay PF, Viljoen M. Lactoferrin: a general review. *Haematologica* 1995;80:252-67.
 20. Hayakawa T, Jin CX, KO SBH, Kitagawa M, Ishiguro H. Lactoferrin in gastrointestinal disease. *Inter Med* 2009;48:1251-4
 21. Langhorst J, Elsenbruch S, Koelzer J, Rueffer A, Michalsen A, Dobos GJ. Noninvasive markers in the assessment of intestinal inflammation bowel disease: performance of fecal lactoferrin, calprotectin, and PMN-elastase, CRP, and clinical indices. *Am J Gastroenterol* 2008;103:162-9.
 22. Kane SV, Sandborn WJ, Rufo PA, Zholudev A, Boone J, Lyerly D, dkk. Fecal lactoferrin is a sensitive and specific marker in identifying intestinal inflammation. *Am J Gastroenterol* 2003;98:1309-14.
 23. Mercado EH, Ochoa TJ, Ecker L, Cabello M, Durand D, Barletta F, dkk. Fecal leukocytes in children infected with diarrheagenic *Escherichia coli*. *JCM* 2011;4:1376-81.
 24. Chin AC, Parkos CA. Pathobiology of neutrophil transepithelial migration: implications in mediating epithelial injury. *Annu Rev Pathol Mech Dis* 2007;2:111-43.