

Pengaruh Pemberian Probiotik Terhadap Integritas Usus pada Obesitas: Uji Coba pada Tikus *Sprague Dawley*

Mira Mariana Ulfah, Ninung Rose Diana Kusumawati
Departemen Ilmu Kesehatan Anak Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro, Semarang

Latar belakang. Obesitas berhubungan dengan perubahan komposisi mikrobiota usus yang dapat mengganggu integritas usus. Protein pengikat *tight junction*, occludin, ekspresinya berkurang saat integritas usus terganggu. Probiotik dilaporkan dapat memperbaiki ekspresi occludin dengan cara modulasi mikrobiota usus.

Tujuan. Membuktikan adanya pengaruh pemberian probiotik terhadap integritas usus melalui peningkatan ekspresi occludin pada obesitas.

Metode. Tiga puluh ekor tikus *Sprague Dawley* jantan dibagi tiga kelompok dan diberi diet berbeda, yaitu kelompok *chow diet* selama 8 minggu (Kn), kelompok *high fat high fructose diet* (HFHFr) selama 12 minggu (Kp), dan kelompok HFHFr selama 12 minggu dilanjutkan dengan pemberian probiotik (*Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium longum*, dan *Streptococcus thermophiles*) selama 8 minggu (P). Setelah selesai masa perlakuan, setiap kelompok dilakukan pemeriksaan imunohistokimia dari potongan jaringan ileum yang diwarnai occludin lalu gambar difoto menggunakan system VS120-S5. Skoring ekspresi occludin menggunakan indeks skala Remmele, *Immuno Reactive Score*, yaitu perkalian skor persentase sel immunoreaktif dengan skor intensitas warna sel immunoreaktif. Uji normalitas distribusi data menggunakan uji *Saphiro Wilk*, kemudian uji beda ekspresi occludin pada ketiga kelompok dengan uji *One Way Anova*, perbedaan bermakna apabila nilai $p < 0,05$.

Hasil. Ekspresi occludin dari yang paling rendah secara berurutan sebagai berikut: Kp (3,64+1,29); P (3,95+1,40); dan Kn (4,71+1,66). Tidak terdapat perbedaan ekspresi occludin yang bermakna pada ketiga kelompok tikus ($p = 0,261$).

Kesimpulan. Pemberian probiotik tidak memberikan pengaruh terhadap integritas usus melalui peningkatan ekspresi occludin pada obesitas.

Sari Pediatri 2022;24(3):157-64

Kata kunci: probiotik, obesitas, integritas usus, occludin

Effect of Probiotic Administration to Gut Integrity in Obesity: Trial in *Sprague Dawley* Mice

Mira Mariana Ulfah, Ninung Rose Diana Kusumawati

Background. Obesity is related to alteration in composition of intestine microbiota which disrupts intestine integrity. Tight junction protein binder, occludin, the expression may lessen if there is a disturbance in intestine integrity. Probiotic is reported can resolve the occludin expression by modulating intestine microbiota.

Objective. Identify if there is an influence of probiotic administration on intestine integrity through increased expression of occludin in obesity.

Method. Thirty *Sprague Dawley* male mice are divided into three groups and had different diet as follow, chow diet group for 8 weeks (Kn), high fat high fructose diet (HFHFr) for 12 weeks (Kp), and HFHFr for 12 weeks continued with administration of probiotic for 8 weeks (P). Immunohistochemistry test was conducted in each group, sample was slice of ileum tissue stained with occludin and then photographed with VS120-S5 system. Occludin expression score using Remelle index, *Immuno Reactive Score*, multiply immunoreactive cell percentage score with immunoreactive cell color intensity score. Normality test for data distribution is processed with Shapiro Wilk, continue with One Way ANOVA test to differentiate the occludin expression in three groups, significant difference with $p < 0.05$.

Result. The lowest occludin expressions were as follows : Kp (3.64 + 1.29); P (3.95 + 1.40); and Kn (4.71 + 1.66). There was no significant difference in occludin expression in the three groups of mice ($p = 0.261$).

Conclusion. Probiotic administration did not have effect to gut integrity by increased occludin expression in obesity. **Sari Pediatri** 2022;24(3):157-64

Keywords: probiotic, obesity, gut integrity, occludin

Alamat korespondensi: Ninung Rose Diana Kusumawati. Departemen Ilmu Kesehatan Anak Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro / RSUP dr. Kariadi, Jl. dr. Sutomo No.16-18, Semarang. E-mail: ikarsdk@gmail.com / roseadhiani@yahoo.co.id

Obesitas adalah masalah kesehatan global yang terus meningkat dengan cepat, memengaruhi lebih dari 107,7 juta anak dan 603,7 juta orang dewasa di seluruh dunia, terhitung lebih dari 60% kematian terkait dengan obesitas. Pencegahan dan pengobatan serta komplikasi obesitas terbukti kompleks sehingga strategi untuk mengatasi kondisi patologis ini masih terbatas.¹

Pengaruh obesitas terhadap saluran cerna mengakibatkan perubahan komposisi pada mikrobiota usus yang disebut disbiosis. Kondisi patologis ini mengakibatkan hubungan yang merugikan antara mikrobiota di dalam usus sehingga dapat mengganggu integritas usus.² Integritas usus yang terganggu dapat merusak *barrier* usus, yaitu suatu sistem pertahanan usus. Komponen utama *barrier* usus adalah lapisan epitel usus, lapisan musin, enterosit, dan *tight junction* sebagai penghubung antar enterosit.³

Tight junction bertanggung jawab terhadap pertahanan *barrier* usus, dengan cara mengontrol ketat pergerakan ion, sel dan air pada lapisan epitel usus serta mencegah masuknya senyawa berbahaya ke dalam aliran darah yang dapat menyebabkan penyakit. Ketika *tight junction* rusak, seringkali akibat *high fat diet*, ikatan antar protein pembangunnya menjadi terganggu sehingga senyawa berbahaya seperti mikroba, bakteri, makanan yang tidak tercerna, dan racun yang seharusnya dihadang, pada keadaan ini memungkinkan “bocor” dan masuk ke aliran darah, disebut *leaky gut syndrome*. *Tight junction* terdiri dari ikatan protein transmembran, yaitu occludin, claudin, *junctional adhesion molecules* (JAM), dan tricellulin; dan protein membran perifer.⁴ Occludin sangat diekspresikan pada sel-sel dan berperan penting dalam pemeliharaan *tight junction*, sehingga keberadaannya merupakan parameter dari integritas usus. Berkurangnya ekspresi occludin mengindikasikan adanya suatu proses *leaky gut* dan menggambarkan integritas usus yang terganggu.⁵

Ekspresi occludin yang berkurang pada *leaky gut* dapat memicu reaksi peradangan dan menyebabkan berbagai masalah kesehatan. Hal ini dapat dicegah dengan memperbaiki disbiosis. Telah banyak dipelajari bahwa modulasi mikrobiota usus merupakan usaha dalam memperbaiki kondisi disbiosis, dan usaha ini dapat dipikirkan sebagai metode pengobatan baru pada obesitas. Selain modifikasi pola makan dan gaya hidup serta operasi bariatrik, modulasi mikrobiota usus secara positif juga dapat dilakukan dengan penggunaan suplementasi probiotik, yaitu sekelompok mikroba baik

yang memberikan manfaat kesehatan saat dikonsumsi dalam jumlah yang memadai. Probiotik bekerja dengan cara mengatur dan menyeimbangkan komposisi mikrobiota usus. Beberapa dekade terakhir, sejumlah penelitian telah fokus pada pengaruh suplementasi probiotik dalam memperbaiki integritas usus untuk meningkatkan kesehatan pada obesitas dan hasilnya masih kontroversial.⁶ Penelitian ini dilakukan untuk mengevaluasi suplemen probiotik pada status kesehatan individu dengan obesitas.

Metode

Hewan uji coba

Tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan galur *Sprague Dawley* berumur 7-8 minggu dengan berat badan berkisar antara 150-160 gram diperoleh dari Laboratorium Penelitian Hewan Percobaan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga Surabaya. Tahap persiapan dilakukan aklimatisasi selama satu minggu. Subyek dipelihara secara individual dalam kandang dengan suhu antara 20-24°C, kelembapan 65%-75% dan diberikan makan dan minum standar *chow diet* secara *ad libitum*. Setelah menjalani aklimatisasi, dipilih 30 ekor tikus sesuai kriteria inklusi dan eksklusi, kemudian dibagi ke dalam tiga kelompok masing-masing 10 ekor tikus, yaitu Kn, tikus diberi *chow diet* selama 8 minggu; Kp, tikus diberi HFHF selama 12 minggu; dan P, tikus diberi HFHF selama 12 minggu, kemudian diberi probiotik selama 8 minggu.

Persiapan probiotik dengan isolasi bakteri, karakterisasi dan identifikasi bakteri, pemurnian dan kemudian memperbanyaknya, dilakukan sesuai prosedur standar. Komposisi probiotik terdiri dari *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium longum*, dan *Streptococcus thermophiles*. Probiotik dalam bentuk cair (pelarut air) diberikan peros menggunakan sonde dengan dosis 1×10^9 cfu/gr per hari.

Pengambilan organ ileum tikus *Sprague Dawley* dilakukan pada minggu ke-8 untuk tikus kelompok Kn, minggu ke-12 untuk tikus kelompok Kp, dan minggu ke-20 untuk tikus kelompok P. Langkah awal dilakukan pembiusan dengan memasukkan tikus ke dalam toples berisi kapas yang ditetesi kloroform, setelah tikus tidur lakukan insisi pada abdomen tikus, kemudian ambil organ ileum dan dimasukkan ke dalam larutan buffer formalin 10%. Tahap akhir lakukan dislokasi servikalis untuk memastikan tikus mati.

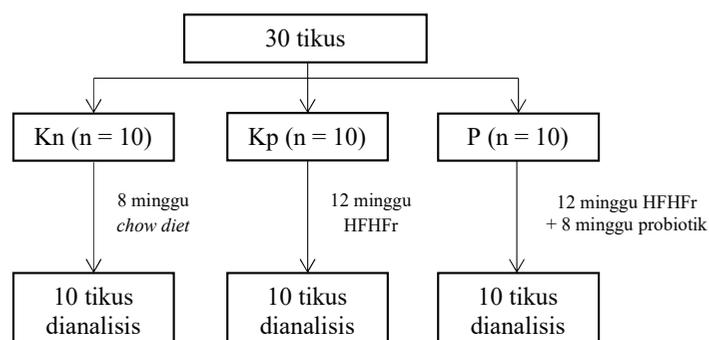
Pemeriksaan imunohistokimia dimulai dengan membuat *slide* dari potongan jaringan ileum setebal 5 μm kemudian direparafin, rehidrasi, dan diblok dengan 10%, 25%, atau 100% serum kambing normal selama dua jam dalam suhu kamar. Kemudian diinkubasi selama satu malam pada suhu 4°C dengan antibodi poliklonal afinitas kelinci murni yang dimurnikan dari komponen struktural usus, atau dengan menggunakan imunoglobulin G kelinci sebagai kontrol. *Slide* ini selanjutnya diwarnai dengan occludin (1:50). Tahap selanjutnya *slide* diinkubasi selama 30 menit dengan antibodi sekunder kambing anti-kelinci terbiolitinasi. Ikatan antibodi divisualisasi dengan kit substrat peroksidase. Gambar jaringan difoto menggunakan sistem VS120-S5.

Penilaian skoring untuk melihat ekspresi occludin dinilai secara semikuantitatif menurut metode Remmele yang sudah dimodifikasi, dengan indeks skala Remmele, *Immuno Reactive Score*, merupakan hasil perkalian antara skor persentase sel immunoreaktif (0 = tidak ada sel positif, 1 = sel positif kurang dari 10%, 2 = sel positif antara 11%-50%, 3 = sel positif antara 51%-80%, 4 = sel positif lebih dari 80%) dengan skor intensitas warna pada sel immunoreaktif (0 = tidak ada reaksi warna, 1 = intensitas warna lemah, 2 = intensitas warna sedang, 3 = intensitas warna kuat).⁷

Dilakukan uji normalitas distribusi data menggunakan uji *Saphiro Wilk* ($n < 50$ subyek) dengan hasil $p > 0,05$, dikatakan distribusi data normal. Data numerik disajikan dalam rerata (standar deviasi). Kemudian dilakukan uji beda ekspresi occludin yang terlihat pada ketiga kelompok dinilai dengan uji *One Way Anova*. Uji beda ekspresi occludin yang terlihat pada kelompok Kn vs Kp, dan pada kelompok Kp vs P dinilai melalui uji *T-test* tidak berpasangan. Perbedaan dianggap bermakna apabila nilai $p < 0,05$ dengan rentang interval kepercayaan yang digunakan adalah 95%. Analisis statistik dilakukan menggunakan perangkat lunak *software statistical package for social science* (SPSS) versi 22.0 *for windows*. *Ethical clearance* penelitian sudah disetujui oleh Komisi Etik Penelitian Kesehatan (KEPK) Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro Semarang dengan nomor 163/EC/H/KEPK/FK-UNDIP/XII/2019.

Hasil

Penelitian ini merupakan uji coba acak terkontrol pada hewan yang telah dilaksanakan pada Januari-Juni 2020. Penelitian dilakukan pada 30 ekor tikus putih *Sprague Dawley* yang telah menjalani aklimatisasi

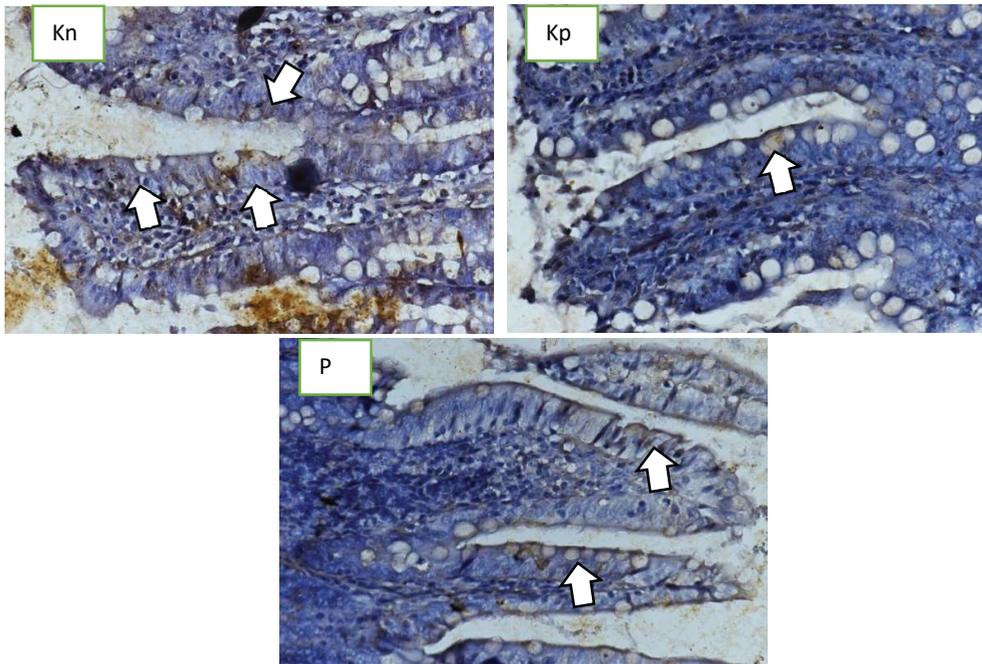


Gambar 1. Consort diagram

Tabel 1. Karakteristik subyek penelitian

Karakteristik	Kn (n=10)	Kp (n=10)	P (n=10)
		Rerata \pm SD	
BB (gram)	131,80 \pm 8,02	262,70 \pm 30,19	227,80 \pm 34,33
PB (cm)	15,55 \pm 0	15,65 \pm 0	15,20 \pm 0
IMT (gr/cm ²)	0,53 \pm 0,05	0,99 \pm 0,14	1,07 \pm 0,11

Kn = *chow diet*, Kp = HFHF, P = HFHF + probiotik, SD = standar deviasi



Gambar 2. Gambaran ekspresi occludin pada berbagai kelompok. Tampak warna coklat kromogen (tanda panah) pada pemeriksaan IHC dengan pembesaran 400x

selama satu minggu dan memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi dibagi secara acak ke dalam tiga kelompok, yaitu kelompok Kn, Kp, dan P. Selama pemantauan tidak didapatkan *drop out*. *Consort diagram* penelitian ditampilkan pada gambar 1. Karakteristik subyek penelitian tertera pada Tabel 1.

Pengambilan organ ileum tikus *Sprague Dawley* dilakukan pada waktu yang berbeda, yaitu pada minggu ke-8 untuk tikus kelompok Kn, minggu ke-12 untuk tikus kelompok Kp, dan minggu ke-20 untuk tikus kelompok P. Perbedaan waktu disesuaikan dengan target status gizi masing-masing kelompok dan ditambah waktu perlakuan untuk kelompok P, yaitu kelompok Kn target tikus dengan status gizi normal, kelompok Kp dengan status gizi obesitas, dan kelompok P dengan status gizi obesitas dan dilanjutkan waktu pemberian probiotik.

Hasil pemeriksaan IHC dinilai dengan menggunakan skoring untuk melihat ekspresi occludin secara semikuantitatif menurut metode indeks skala Remmele. Skor presentase sel immunoreaktif dikalikan dengan skor intensitas warna pada sel immunoreaktif tersebut.

Hasil pemeriksaan IHC pada gambar 2 menunjukkan

ekspresi occludin ileum yang ditandai dengan adanya warna coklat kromogen di antara sel epitel. Ekspresi occludin tampak lebih banyak pada kelompok Kn, dan paling sedikit terlihat pada kelompok Kp. Pada kelompok P tampak ekspresi occludin di beberapa tempat, tetapi tidak sebanyak pada kelompok Kn.

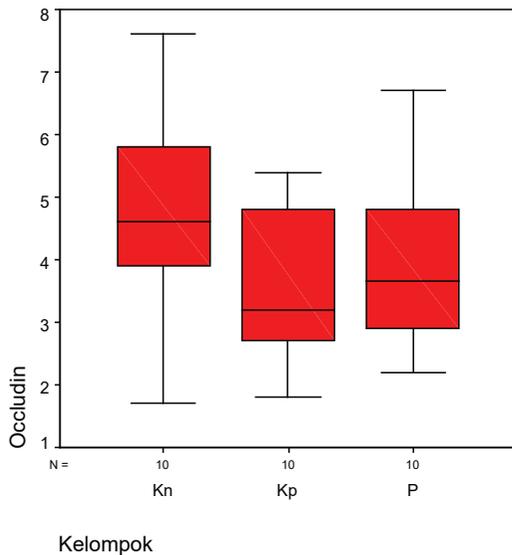
Distribusi data ekspresi occludin pada ketiga kelompok secara deskriptif tertera pada Gambar 3. Nilai tengah ekspresi occludin paling tinggi terdapat pada kelompok Kn, paling rendah pada kelompok Kp, dan kelompok P berada di antaranya. Sebaran data kelompok Kn dan P sama, sementara data pada kelompok Kp lebih tersebar dibanding dua kelompok lainnya. Tidak ada data yang simetris pada ketiga kelompok, dan tidak ada data *outlier* ataupun ekstrem. Tabel 2 menunjukkan bahwa perbedaan rerata ekspresi occludin pada ketiga kelompok tersebut tidak bermakna ($p=0,261$).

Dilakukan uji beda antara Kn dengan Kp dan antara Kp dengan P, hasilnya tidak terdapat perbedaan bermakna pada ekspresi occludin antara kelompok tersebut dengan nilai p secara berurutan $p=0,126$ dan $p=0,615$.

Tabel 2. Hasil uji beda ekspresi occludin pada ketiga kelompok penelitian

Variabel	Kn	Kp	P	Nilai p
	Rerata±SD	Rerata±SD	Rerata±SD	
Ekspresi occludin	4,71±1,66	3,64±1,29	3,95±1,40	0,261 ^{∗∗}

Kn = *chow diet*, Kp = HFHFr, P = HFHFr + probiotik, SD = standar deviasi; [∗]signifikan (p<0,05); ^{∗∗}*One Way Anova*



Gambar 3. Ekspresi occludin pada ketiga kelompok penelitian

Pembahasan

Penelitian ini menilai ekspresi occludin ketiga kelompok percobaan berdasarkan preparat imunohistokimia, diagram *box plot* dan perhitungan nilai rerata. Ekspresi occludin dari yang paling rendah secara berurutan sebagai berikut, kelompok Kp, tikus obesitas dan tidak mendapatkan probiotik (3,64±1,29); kelompok P, tikus obesitas dan mendapatkan probiotik (3,95±1,40); dan kelompok Kn, tikus tidak obesitas dan tidak mendapatkan probiotik (4,71±1,66).

Penelitian ini serupa dengan penelitian Balakumar dkk.⁸ yang membandingkan profil *tight junction* pada tikus jantan C57BL/6J dengan perlakuan berbeda, yaitu tikus diberikan diet normal, tikus diberikan *high fat diet*, dan tikus yang diberikan *high fat diet* kemudian diberikan tiga jenis probiotik, yaitu LGG, MTCC 5690, dan MTCC 5689. Hasilnya menunjukkan ekspresi protein occludin dan ZO-1 *tight junction* usus paling tinggi pada tikus yang diberikan diet normal,

paling rendah pada tikus yang diberikan *high fat diet*, dan pada tikus yang diberikan *high fat diet* kemudian probiotik tampak nilai ekspresi occludin di antara kedua kelompok lainnya.

Penelitian ini mendapatkan hasil rerata ekspresi occludin yang berbeda pada ketiga kelompok sesuai dengan teori mengenai integritas usus. Nilai ekspresi occludin menunjukkan kekuatan ikatan protein pembangun *tight junction*, semakin tinggi nilai ekspresi occludin maka semakin kuat *tight junction* dan semakin baik integritas lapisan epitel tersebut.⁹ zonula occludens Tikus tidak obesitas pada kelompok Kn mewakili kelompok tikus dengan integritas usus baik, sehingga ekspresi occludin yang tampak pada kelompok Kn dijadikan sebagai nilai standar normal. Inflamasi ringan kronis yang dialami tikus obesitas pada kelompok Kp menunjukkan ekspresi occludin yang lebih rendah dibanding nilai standar normal. Berkurangnya ekspresi occludin pada obesitas diakibatkan oleh *high fat diet* yang memicu terjadinya disbiosis, kemudian merusak *barrier* usus dan selanjutnya mengganggu ikatan antar protein pada *tight junction* termasuk occludin.^{4,7} Tikus obesitas yang mendapatkan probiotik pada kelompok P tampak mengalami perbaikan ikatan protein *tight junction* dengan menunjukkan ekspresi occludin yang lebih baik dibandingkan kelompok Kp. Probiotik dapat memodulasi mikrobiota usus sehingga kondisi disbiosis dapat diperbaiki, yang pada gilirannya akan memperkuat integritas *tight junction*.⁶

Penelitian ini serupa dengan penelitian Salazar dkk.¹⁰ yang menggunakan tikus jantan C57BL/6J yang diberikan *high fat diet* kemudian pada kelompok perlakuan dilanjutkan dengan pemberian *Bifidobacterium animalis* IPLA R1 selama 10 hari. Hasil penelitian Salazar dkk, baik kelompok perlakuan maupun kelompok kontrol tidak menunjukkan perbedaan yang bermakna pada ekspresi protein *tight junction* (occludin dan *tight junction protein 1*). Sama halnya dengan Bomhof dkk.¹¹ yang mengamati tikus jantan *Sprague Dawley* yang diberi *high fat diet* selama 8 minggu lalu diberi probiotik dengan kandungan *Bifidobacterium animalis* subspecies

lactis BB-12 selama 8 minggu. Hasil penelitian Bomhof dkk¹¹ tidak terdapat perbedaan bermakna dari ekspresi mRNA occludin usus antara kelompok tikus perlakuan dan kelompok kontrol.

Penelitian yang berbeda dengan penelitian ini, antara lain, penelitian Ahmadi dkk¹² yang menggunakan tikus jantan yang diberi *high fat diet* kemudian diberikan probiotik *Lactobacillus* dan *Enterococcus* selama 10 minggu. Hasil penelitian Ahmadi dkk¹² menunjukkan bahwa terapi probiotik secara bermakna meningkatkan ekspresi mRNA protein *tight junction*, yaitu occludin dan ZO-1, dalam jaringan usus tikus obesitas. Penelitian lain yang juga berbeda, yaitu Kim dkk¹³ dengan subyek tikus jantan yang diberi *high fat diet* kemudian diberikan probiotik *Bacillus* selama 13 minggu. Level dari ekspresi protein occludin pada kelompok perlakuan secara bermakna lebih tinggi dibandingkan kelompok kontrol. Hasil penelitian Jena dkk¹⁴ berbeda juga dengan penelitian ini, kelompok tikus C57BL/6 perlakuan diberikan *western diet* yang mengandung 21,2% lemak, 34% sukrosa, dan 0,2% kolesterol serta diberikan probiotik VSL#3 yang mengandung empat spesies *Lactobacillus* (*L. paracasei*, *L. plantarum*, *L. acidophilus*, dan *L. delbrueckii* subspesies *bulgaricus*), tiga spesies *Bifidobacterium* (*B. longum*, *B. lactis*, dan *B. breve*), dan *Streptococcus thermophiles* selama 7 bulan, hasilnya terjadi peningkatan profil ekspresi occludin dan claudin-1 pada ikatan *tight junction*.

Probiotik tidak bekerja seperti kebanyakan obat yang secara langsung menargetkan pada suatu titik tangkap tertentu. Probiotik bekerja secara bertahap dengan cara menambahkan mikrobiota baik pada mukosa usus sehingga mengurangi beban mikrobiota patogen, yang kemudian menciptakan keseimbangan mikrobiota pada usus.¹⁵ Epitel usus selalu terpapar oleh isi lumen usus dan flora usus yang dinamis dan beranekaragam, dan integritasnya dijaga oleh *barrier* usus. Apabila fungsi *barrier* ini terganggu, maka bakteri dan antigen makanan dapat mencapai submukosa dan dapat menginduksi respon inflamasi, yang kemudian dapat mengakibatkan gangguan usus. Probiotik dapat meningkatkan fungsi *barrier* usus, tetapi berdasarkan sifat kerjanya yang tidak secara langsung maka waktu yang dibutuhkan probiotik untuk memperbaiki fungsi *barrier* usus bergantung pada tingkat kerusakan dari *barrier* itu sendiri.¹⁶

Dibandingkan dengan penelitian sebelumnya, dapat kita lihat adanya perbedaan waktu dalam pemberian probiotik pada kelompok perlakuan. Penelitian lain

yang mendapatkan hasil berbeda bermakna untuk ekspresi occludin terjadi pada penelitian dengan waktu pemberian probiotik lebih lama dibandingkan dengan penelitian ini, sedangkan penelitian lain dengan hasil yang serupa dengan penelitian ini terjadi pada penelitian dengan waktu pemberian probiotik yang sama atau lebih singkat dibanding penelitian ini. Kemungkinan lama pemberian probiotik berpengaruh terhadap ekspresi occludin yang tidak berbeda bermakna pada penelitian ini.

Uji beda yang dilakukan antara kelompok tidak obesitas dan kelompok obesitas tanpa diberikan probiotik (Kn vs Kp) mendapatkan hasil ekspresi occludin yang tidak berbeda bermakna pada kedua kelompok tersebut. Berbeda dengan penelitian Sambolin-Escobales dkk,¹⁷ penelitian menggunakan dua kelompok tikus yang diberi diet berbeda masing-masing selama 14 hari, kelompok tikus *low fat diet* sebagai tikus tidak obesitas dan kelompok tikus *high fat diet* sebagai tikus obesitas, didapatkan bahwa terjadi penurunan bermakna untuk ekspresi protein occludin dan claudin-5 pada kelompok tikus *high fat diet* dibandingkan dengan kelompok tikus *low fat diet*. Kemungkinan komposisi dan keanekaragaman mikrobiota usus tikus subyek saat awal penelitian berpengaruh pada ekspresi occludin yang didapatkan saat akhir penelitian.

Komposisi mikrobiota usus sangat bervariasi sebagai respon terhadap faktor intrinsik dan ekstrinsik termasuk latar belakang genetik, jenis kelamin, usia dan lingkungan seperti diet, aktivitas fisik, dan geografis.¹⁸ Beberapa penelitian yang menyelidiki komposisi mikrobiota telah menunjukkan bahwa faktor lingkungan lebih berperan penting dalam membentuk ekosistem mikroba usus.¹⁹ Penelitian yang mempelajari keanekaragaman mikrobiota usus pada hewan dilakukan oleh Goertz dkk²⁰ dengan menggunakan subyek tikus *Mus musculus domesticus* yang ditangkap di Isle of May, Fifth of Forth, Skotlandia. Sebanyak 79 tikus telah ditangkap pada 10 titik lokasi yang berbeda, dengan jarak antar titik sejauh 1-3 meter, kemudian dinilai komposisi mikrobiota pada bagian caecum tikus. Hasilnya adalah didapatkan hubungan yang bermakna dari keanekaragaman mikrobiota usus tikus pada berbagai lokasi penangkapan tikus tersebut, terutama keanekaragaman pada tingkat spesies.

Pengaruh lingkungan yang sangat kuat terhadap mikrobiota usus kemungkinan berkaitan dengan hasil tidak bermakna pada penelitian ini. Mikrobiota usus tikus awal yang digunakan kemungkinan berbeda

dengan mikrobiota usus tikus awal yang digunakan pada penelitian lain dengan hasil bermakna yang dilakukan di negara berbeda. Pada penelitian ini tidak dilakukan pemeriksaan komposisi mikrobiota usus tikus saat tahap persiapan sebagai data awal dan dijadikan pedoman dalam peresapan probiotik yang akan digunakan untuk perlakuan. Penelitian ini menggunakan probiotik berisi *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium longum*, dan *Streptococcus thermophiles* yang mengacu pada penelitian sebelumnya yang dilakukan di negara lain. Bakteri-bakteri tersebut telah memberikan efek menguntungkan dalam mengelola obesitas karena sifat patogenitas dan tingkat resistensi antibiotik rendah.²¹ Kemungkinan pemberian probiotik sesuai standar negara lain tidak dapat memperbaiki ikatan occludin pada *tight junction* epitel usus tikus obesitas pada penelitian ini.

Kelemahan dari penelitian ini adalah tidak tersedia data awal komposisi mikrobiota usus pada subyek sebelum diberikan perlakuan.

Kesimpulan

Penelitian ini menunjukkan bahwa pemberian probiotik tidak dapat memperbaiki integritas usus melalui peningkatan ekspresi occludin pada obesitas. Sebaiknya dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai pengaruh probiotik terhadap integritas usus pada obesitas dengan pemberian probiotik yang lebih lama dari 8 minggu dan dilakukan pemeriksaan mikrobiota usus subyek saat awal penelitian. Pemberian probiotik yang lebih lama dapat memperbaiki ikatan occludin lebih banyak sehingga dapat menghasilkan gambaran ekspresi occludin pada pemeriksaan imunohistokimia yang lebih nyata.

Ucapan terima kasih

Terima kasih kepada Laboratorium Penelitian Hewan Percobaan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga Surabaya yang telah memfasilitasi dan membantu kami dalam penelitian ini. Terima kasih juga kepada komisi etik penelitian Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro Semarang yang telah mengijinkan penelitian ini berlangsung.

Daftar pustaka

1. Afshin A, Forouzanfar MH, Reitsma MB, dkk. Health effects of overweight and obesity in 195 countries over 25 years. *N Engl J Med* 2017;377:13-27.
2. Kamada N. Role of the gut microbiota in immunity and inflammatory disease. *Nat rev Immunol* 2013;13:321-35.
3. Müller CA, Autenrieth IB, Peschel A. Innate defenses of the intestinal epithelial barrier. *Cell Mol Life Sci* 2005;62:1297-307.
4. Harhaj NS, Antonetti DA. Regulation of tight junctions and loss of barrier function in pathophysiology. 2004;36:1206-37. belum ada nama jurnalnya
5. Suzuki T. Regulation of intestinal epithelial permeability by tight junctions. *Cell Mol Life Sci* 2013;70:631-59.
6. Kobylak N, Conte C, Cammarota G, dkk. Probiotics in prevention and treatment of obesity: A critical view. *Nutr Metab* 2016;13 belum ada halamannya
7. Nowak M, Madej JA, Dziegiel P. Intensity of COX2 expression in cells of soft tissue fibrosarcomas in dogs as related to grade of tumour malignancy. *Bull Vet Inst Pulawy* 2007;51:275-9.
8. Balakumar M, Prabhu D, Sathishkumar C, dkk. Improvement in glucose tolerance and insulin sensitivity by probiotic strains of Indian gut origin in high-fat diet-fed C57BL/6J mice. *Eur J Nutr* 2018;57:279-95.
9. Cummins PM. Occludin: One Protein, Many Forms. *Mol Cell Biol* 2012;32:242-50.
10. Salazar N, Neyrinck AM, Bindels LB, dkk. Functional effects of EPS-producing bifidobacterium administration on energy metabolic alterations of diet-induced obese mice. *Front Microbiol* 2019;10:1-12.
11. Bomhof MR, Saha DC, Reid DT, Paul HA, Reimer RA. Combined effects of oligofructose and Bifidobacterium animalis on gut microbiota and glycemia in obese rats. *Obesity* 2014;22:763-71.
12. Ahmadi S, Wang S, Nagpal R, dkk. A human-origin probiotic cocktail ameliorates aging-related leaky gut and inflammation via modulating the microbiota/taurine/tight junction axis. *JCI Insight* 2020;5:1-18.
13. Kim B, Kwon J, Kim M, Park H, Ji Y, Holzapfel W. Protective effects of Bacillus probiotics against high-fat diet-induced metabolic disorders in mice. *PLoS One*. Diunduh pada 4 Agustus 2022. Didapat dari: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0210120>.
14. Jena PK, Sheng L, Li Y, Wan Y-JY. Probiotics VSL#3 are effective in reversing non-alcoholic steatohepatitis in a mouse model. *Hepatobiliary Surg Nutr* 2020;9:170-82.
15. Butel MJ. Probiotics, gut microbiota and health. *Med Mal Infect* 2014;44:1-8.
16. Sudarmo S, Chairunita, Basrowi R. Peran probiotik untuk kesehatan pencernaan. 2018. Diunduh pada 4 Agustus 2022. Didapat dari: <http://www.researchgate.net/publication/325987118>.

17. Sambolin-Escobales L, Nazario M, Torres-Aguilar R, dkk. A High fat diet induces decreased levels of colonic tight junctions and inflammatory cytokine expression in sprague dawley rats. *The FASEB J* 2016;30:698.
18. Guarner, F. & Malagelada, J. R. Gut flora in health and disease. *Lancet* 2013; 361:512-19.
19. Rothschild D, Weissbrod O, Barkan E, dkk. Environment dominates over host genetics in shaping human gut microbiota. *Nature* 2018; 555:210-15.
20. Goertz S, Menezes AB De, Birtles RJ, dkk. Geographical location influences the composition of the gut microbiota in wild house mice (*Mus musculus domesticus*) at a fine spatial scale. *Plos One* 2019;1-16.
21. Abenavoli L, Scarpellini E, Colica C, dkk. Gut microbiota and obesity: A role for probiotics. *Nutrients* 2019;11:1-27.