

- TOXOPLASMA

IR - PERPUSTAKAAN UNIVERSITAS AIRLANGGA

- IMMUNISASI

- TOXOPLASMA GONDII

44
TKD 2165
P19
P

TESIS

**PENINGKATAN IMUNOGLOBULIN G PADA MENCIT (*MUS MUSCULUS*)
SETELAH IMUNISASI ANTIGEN PROTEIN SOLUBEL (SPTAg)
TOXOPLASMA GONDII DENGAN ATAU TANPA AJUVAN
TOKSIN KOLERA (CT) SECARA INTRANASAL**

PENELITIAN EKSPERIMENTAL LABORATORIS



MORIKO PRATININGRUM

**PROGRAM PASCA SARJANA
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA**

2004

Telah diuji pada
Tanggal 17 Agustus 2004
PANITIA PENGUJI TESIS

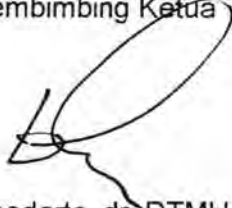
- Ketua : Prof. Dr. Sri Subekti B.S., drh, DEA
- Anggota : 1. Prof. H. Soedarto, dr., DTMH, PhD
2. Suhintam Pusarawati, drh, MS
3. Heny Arwati, Dra, MSc, PhD
4. Dr. Fedik Abdul Rantam, drh
5. Muhammad Cholil Munif, dr., AIF

Persetujuan

TESIS INI TELAH DISETUJUI
PADA TANGGAL September 2004

Oleh :

Pembimbing Ketua



Prof H Soedarto, dr, DTMH, PhD
NIP 130550713

Pembimbing



Suhintam Pusrarwati, drh, MS
NIP 131760374

Mengetahui,

Ketua Program Studi Ilmu Kedokteran Dasar
Program Pasca Sarjana Universitas Airlangga

Prof Retno Handajani, dr, MS, PhD
NIP 130541984

UCAPAN TERIMA KASIH

Bismillahirrahmaanirrahim

Pertama-tama saya panjatkan puji syukur kehadirat Allah yang Maha Pengasih lagi Maha Penyayang atas segala rahmat dan karunia-Nya sehingga tesis ini dapat diselesaikan.

Didalam penyelesaian tesis ini banyak hambatan dan rintangan yang tidak mungkin teratasi tanpa bimbingan, bantuan serta dorongan dari berbagai pihak. Untuk itu dengan setulus hati perkenankanlah saya ucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada yang tersebut dibawah ini.

Terima kasih tak terhingga dan penghargaan yang setinggi-tingginya saya ucapkan kepada Prof. Soedarto, MD., DTMH., PhD sebagai Pembimbing Ketua yang dengan penuh perhatian telah memberikan dorongan, bimbingan dan saran.

Terima kasih tak terhingga dan penghargaan yang setinggi-tingginya saya ucapkan kepada Ibu Suhintam Pusarawati, drh, MS, sebagai Pembimbing Kedua yang dengan penuh perhatian dan kesabaran telah memberikan dorongan, bimbingan dan saran.

Terima kasih tak terhingga dan penghargaan yang setinggi-tingginya saya ucapkan kepada Ibu Heny Arwati, Dra, MSc, PhD, sebagai Penguji yang dengan teliti mengoreksi, membimbing dan memberi saran.

Saya ucapkan terima kasih sebesar-besarnya kepada Ketua Program Studi Bioteknologi UGM drh. Wayan T Artama, PhD yang telah memberikan bantuan dan ijin penggunaan laboratorium.

Saya ucapkan terima kasih sebesar-besarnya kepada Didik Tulus Subekti, drh, MS yang telah memberikan bimbingan dan bantuan sehingga meringankan beban saya dalam menyelesaikan tesis ini.

Dengan selesainya tesis ini, perkenankanlah saya mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada:

Rektor Universitas Airlangga Prof. Dr.Med. H. Puruhito, dr, Sp.BTKV atas kesempatan yang diberikan kepada saya untuk mengikuti dan menyelesaikan pendidikan program Magister pada Program Pascasarjana Universitas Airlangga. Direktur Program Pascasarjana Universitas Airlangga Prof. DrMed. H. Muhammad Amin, dr., Sp.P atas kesempatan untuk menjadi mahasiswa Program Magister pada Program Pascasarjana Universitas Airlangga.

Mantan Ketua Program Studi Ilmu Kedokteran Dasar PPs Unair Prof. Soetjipto, dr., M.Sc., PhD. saya ucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya dan penghargaan yang setinggi-tingginya karena telah membantu didalam proses pelaksanaan ujian proposal dan tesis.

Ketua Program Studi Ilmu Kedokteran Dasar PPs Unair Prof. Retno Handajani, dr., MS., PhD. saya ucapkan terima kasih karena telah membantu didalam proses pelaksanaan ujian tesis.

Ketua minat Studi Parasitologi Kedokteran PPs Unair Bapak Machfudz, dr., DTMH., MS yang telah banyak memberikan bimbingan, dorongan selama saya menuntut ilmu di minat Studi Parasitologi hingga menyelesaikan tesis ini.

Kepada seluruh staf pengajar Program Pascasarjana Unair dan staf pengajar minat Studi Parasitologi Kedokteran PPs Unair, saya ucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya atas bantuan dan ilmu yang diberikan serta wawasan yang sangat berguna bagi perjalanan karir saya selanjutnya sebagai seorang pendidik.

Kepada Ketua Program Pendidikan Dokter Unmul dr. H. Latif Choibar C, Sp.PD yang telah memberi kesempatan kepada saya untuk mengikuti Pendidikan Program Magister di Unair saya ucapkan terima kasih.

Kepada Rektor Universitas Mulawarman Prof. Ir. H. Rachmad Hernadi, M.Sc. yang telah memberi ijin kepada saya untuk mengikuti Pendidikan Program Magister di Unair saya ucapkan terima kasih.

Saya ucapkan terima kasih kepada Pemerintah Propinsi Kalimantan Timur yang telah memberikan beasiswa sehingga saya dapat menyelesaikan program Magister.

Kepada teman-teman dr. Mona Zubaidah dan drh. Ocky Dwi Suprobowati, serta seluruh laboran di Laboratorium Pusat Bioteknologi Fakultas Kedokteran UGM yang telah memberikan bantuan sehingga saya dapat menyelesaikan tesis ini.

Kepada suami dr. Ihya Ridlo Nizomy, M.Kes dan anaknda lhza Mu'affi Azmi Nizomy, yang selalu memberikan semangat, serta ayanda Prof. Dr. Ir. H. Bandi Suprptoно, M.Agr serta ibunda Siti Partini, SE yang memberikan dukungan moral saya ucapkan terima kasih.

Billahit taufik wal hidayah, wassalamu'alaikum wr. wb.

Surabaya, September 2004

Penulis

RINGKASAN

**PENINGKATAN IMUNOGLOBULIN G PADA MENCIT (*MUS MUSCULUS*)
SETELAH IMUNISASI ANTIGEN PROTEIN SOLUBEL (SPTAg) *TOXOPLASMA GONDII*
DENGAN ATAU TANPA AJUVAN TOKSIN KOLERA (CT)
SECARA INTRANASAL**

Moriko Pratinigrum

Respon imun humoral sistemik terhadap toksoplasmosis yang bertahan lama adalah imunoglobulin G. Imunoglobulin ini dapat dideteksi setelah infeksi parasit atau imunisasi dengan vaksin hidup maupun subunit antigen parasit. Salah satu kandidat dari subunit antigen *Toxoplasma gondii* adalah Antigen Protein Solubel (SPTAg). Penggunaan SPTAg dimaksudkan untuk menginduksi respon imun, dengan aplikasi intranasal yang merupakan salah satu rute imunisasi yang efektif untuk menginduksi respon imun. Ajuvan Toksin Kolera (CT) digunakan untuk memperbaiki dan meningkatkan kemampuan sistem imun mukosa untuk merespon SPTAg yang diberikan.

Penelitian ini bertujuan untuk memperoleh gambaran respon imun IgG dengan imunisasi SPTAg *T.gondii* dengan atau tanpa ajuvan CT secara intranasal dari serum hewan coba. Secara khusus, penelitian ini bertujuan untuk : (1) membuktikan terdapatnya perbedaan gambaran respon imun IgG setelah imunisasi SPTAg *T. gondii* yang diaplikasikan secara intranasal dengan atau tanpa menggunakan ajuvan CT, (2) membuktikan terdapatnya pengaruh waktu terhadap gambaran respon imun IgG mencit setelah imunisasi SPTAg *T. gondii* yang diaplikasikan secara intranasal dengan atau tanpa menggunakan ajuvan CT, dan (3) membuktikan terdapatnya interaksi antara waktu imunisasi dan perlakuan pada respon imun IgG mencit setelah imunisasi SPTAg *T. gondii* yang diaplikasikan secara intranasal dengan atau tanpa menggunakan ajuvan CT.

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratoris dengan rancangan Faktorial Sama Subyek, menggunakan 60 ekor mencit (*Mus musculus*) BALB/c betina, umur 6 –8 minggu dibagi dalam 3 kelompok perlakuan yaitu kelompok imunisasi SPTAg, kelompok imunisasi SPTAg dengan ajuvan CT serta kelompok kontrol negatif yang diberikan PBS. Imunisasi 1 kali diberikan pada minggu pertama. Serum diambil dari pleksus orbitalis hewan coba 1 minggu setelah imunisasi dan dilakukan selama 4 minggu berturut-turut. Respon imun IgG ditentukan dari nilai *Optical Density* (OD) yang diperoleh dari pemeriksaan ELISA *indirect*. Data hasil penelitian kemudian dianalisis dengan uji Anova Faktorial Sama Subyek menggunakan program SPSS 10.0.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa imunisasi intranasal SPTAg tanpa ajuvan CT dapat meningkatkan respon imun IgG lebih tinggi daripada imunisasi intranasal SPTAg dengan ajuvan CT baik pada minggu I, II, III dan IV. Pada analisis statistik, pertama, terdapat perbedaan yang bermakna dengan nilai $p=0,017$ ($p<0,05$) pada gambaran respon imun IgG antara imunisasi SPTAg intranasal baik dengan ajuvan CT maupun tanpa ajuvan CT; kedua, tidak terdapat pengaruh waktu yang bermakna dengan nilai $p=0,474$ ($p>0,05$) pada respon imun IgG pada imunisasi SPTAg intranasal baik dengan ajuvan CT ataupun tanpa ajuvan CT; ketiga, tidak terdapat efek interaksi waktu dan perlakuan yang bermakna dengan nilai $p=0,882$ ($p>0,05$) baik pada imunisasi SPTAg intranasal baik dengan ajuvan CT ataupun tanpa ajuvan CT. Dengan demikian sebagai kesimpulan pada penelitian ini, imunisasi SPTAg intranasal dengan atau tanpa

ajuvan CT dapat menginduksi peningkatan respon imun IgG. Sedangkan titer IgG pada imunisasi SPTAg dan CT tidak meningkat kemungkinan karena waktu perlakuan yang pendek.

SUMMARY

**THE INCREASE OF IMMUNOGLOBULIN IN MICE (*MUS MUSCULUS*) AFTER
INTRANASAL IMMUNIZATION OF *TOXOPLASMA GONDII* SOLUBLE
PROTEIN ANTIGEN'S (SPTAg) WITH OR WITHOUT
CHOLERA TOXIN (CT) ADJUVANT**

Moriko Pratiningrum

Immunoglobulin G (IgG) was a systemic humoral immune response after immunization with live vaccine or subunit antigen of *T. gondii*. Soluble protein SPTAg is a subunit antigen from *T. gondii*. Immunization SPTAg intranasally was aimed to induce immune response in mice. *Cholerae Toxin* (CT) adjuvant was used to restore and improve the capability of mucosal immune system to respond the immunization of SPTAg. The purpose of this study is to : (1) investigate the difference of IgG immune response after intranasally immunization with SPTAg without and with CT adjuvant; (2) find out the effect serum collection of time to the IgG immune response immunized with SPTAg alone and SPTAg + CT adjuvant; and (3) disclose interaction effect of serum collection times and treatment to the IgG immune response after intranasally immunization with SPTAg alone and SPTAg + CT.

This experimental study used factorial design, involving 60 female BALB/c mice aged 6 – 8 weeks and divided into 3 groups; first group was immunized with SPTAg; second group was immunized with SPTAg + CT; third group, as negative control, was treated with PBS only. Immunization was done once at the beginning of the course of this study. Sera from mice were collected from plexus orbitalis every once a week up to week 4 post immunization. The immune response of IgG was determined by measuring Optical Density (OD) of IgG sera using ELISA method. The data were analyzed using factorial anova test with SPSS computerized program version 10.0.

The result showed, that application intranasally of SPTAg without adjuvant increased immune response of IgG higher than that of SPTAg + CT during four sequence weeks of this study. On the other hand, immunization with SPTAg + CT induced low immune response of IgG on the 1st, 2nd, 3rd and 4th week post immunization. Based on the statistical analysis showed, that first, the immune response of IgG in mice immunized with SPTAg alone and SPTAg + CT was different significantly ($p < 0.05$); second, there was no significant effect ($p > 0.05$) of serum collection time to the immune response of IgG; and three, there was not significant interaction effect ($p > 0.05$) of serum collection time and treatment to the IgG immune response after intranasally immunization with SPTAg alone and SPTAg + CT adjuvant. Conclusively, the result suggested that the immunization of SPTAg intranasally with or without CT adjuvant could induced the systemic humoral immune response. While, the low level of IgG in mice immunized with SPTAg + CT, probably because the length of this study was too short, therefore, this immune response apparently was just the beginning of the whole immune response to the immunogen.

ABSTRACT

THE INCREASE OF IMMUNOGLOBULIN G IN MICE (*MUS MUSCULUS*) AFTER INTRANASAL IMMUNIZATION OF *TOXOPLASMA GONDII* SOLUBLE PROTEIN ANTIGEN'S (SPTAg) WITH OR WITHOUT CHOLERA TOXIN (CT) ADJUVANT

Moriko Pratiningrum

This research was conducted to; (1) investigate the difference of IgG immune response (2) find out the effect serum collection time to the IgG immune response (3) disclose interaction effect of serum collection time and treatments to the IgG immune response in mice after intranasally immunization with *T. gondii* SPTAg alone and *T. gondii* SPTAg with cholera toxin (CT) adjuvant. The design used in this study was factorial design, involving 60 female BALB/c mice aged 6 – 8 weeks and divided into 3 treatment groups: first group was immunized with SPTAg; second group was immunized with SPTAg+CT, and third group as negative control group treated with PBS only. Immunization was done once at the beginning of the course of this study. Serum collected was performed from plexus orbitalis punctured every once a week up to week four post immunization. The immune response of IgG were determined by measuring the Optical Density (OD) of IgG serum using ELISA method. The data were then analyzed using factorial anova test with SPSS computerized program version 10.0. The result showed, that the immune response of IgG in mice immunized intranasally with SPTAg without adjuvant higher than that of mice immunized with SPTAg+CT during four sequence weeks of the study. On the other hand, immune response of IgG in mice immunized with SPTAg+CT was low on 1st, 2nd, 3rd and 4th weeks post immunization. Based on the statistical analysis showed that, (1) the immune response of IgG between immunization with SPTAg alone and SPTAg+CT was significantly different ($p < 0.05$) and (2), there was not significant effect ($p > 0.05$) of serum collection time and the immune response of IgG; and (3), there was not significant interaction effect ($p > 0.05$) between serum collection time and treatments to the IgG immune response after intranasally immunization with SPTAg alone and SPTAg+CT. Conclusively, these result suggested, that the immunization of SPTAg intranasally with or without CT adjuvant was able to induce the systemic humoral immune response in mice. The low level of IgG in mice immunized with SPTAg+CT, probably because the length of this study was too short, therefore, this immune response apparently was just the beginning of the whole immune response to the immunogen.

Keyword : *T. gondii* SPTAg – CT Adjuvant – Intranasal Immunization – Optical Density IgG

DAFTAR ISI

	Halaman
Sampul Depan	i
Sampul Dalam	ii
Prasyarat Gelar	iii
Persetujuan	iv
Penetapan Panitia	v
Ucapan Terima Kasih	vi
Ringkasan	viii
Summary	x
Abstract	xi
DAFTAR ISI	xii
DAFTAR TABEL	xiii
DAFTAR GAMBAR	xiv
DAFTAR SINGKATAN	xv
DAFTAR LAMPIRAN	xvi
 BAB 1 PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	4
1.3 Tujuan Penelitian	4
1.3.1 Tujuan Umum	4
1.3.2 Tujuan Khusus	5
1.4 Manfaat Penelitian	5
1.4.1 Manfaat Teoritis	5
1.4.2 Manfaat Terapan	5
 BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA	
2.1 Sifat-sifat Biologis <i>T. gondii</i>	6
2.1.1 Morfologi dan Siklus Hidup <i>T. gondii</i>	6
2.2 Patogenesis Toksoplasmosis pada Manusia	9
2.3 Respon Imun Humoral terhadap Toksoplasmosis	11
2.4 Respon Imun Seluler pada Toksoplasmosis	12
2.5 Imunogen pada Infeksi <i>T. gondii</i>	14
2.6 Antigen Permukaan <i>T. gondii</i>	15

2.7	Antigen dari Mikronema (MIC) dan Rhoptri (ROP)	16
2.8	Antigen Beredar dari Granula Padat (GRA)	17
2.9	Antigen SPTAg dari <i>T. gondii</i>	18
2.10	Ajuvan Toksin Kolera (CT)	18
2.10.1	Respon yang Ditimbulkan Toksin Kolera	19
2.11	Aplikasi Imunisasi Intranasal	21
 BAB 3 KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS		
3.1	Kerangka Konseptual Pemikiran	23
3.2	Hipotesis Penelitian	27
 BAB 4 METODE PENELITIAN		
4.1	Rancangan Penelitian	28
4.2	Populasi, Sampel, Besar Sampel dan Teknik Pengambilan Sampel	29
4.3	Variabel Penelitian	30
4.3.1	Variabel Bebas	30
4.3.2	Variabel Tergantung	30
4.4	Definisi Operasional Penelitian	30
4.5	Bahan Penelitian	31
4.6	Instrumen Penelitian	31
4.7	Prosedur Penelitian	31
4.7.1	Tahap Isolasi Antigen	31
4.7.2	Cara Imunisasi	34
4.7.3	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)</i>	34
4.8	Lokasi dan Waktu Penelitian	35
4.9	Tahapan Analisis Data	35
 BAB 5 ANALISIS HASIL		
5.1	Hasil Penelitian	37
5.2	Hasil Uji Deskriptif	38
5.3	Hasil Uji Normalitas Distribusi Data	39
5.4	Hasil Uji Anova Faktorial Sama Subyek	40
5.4.1	Variabel waktu	40
5.4.2	Variabel perlakuan	40
5.4.3	Variabel waktu dan variabel perlakuan	42

5.5	Hasil Deskripsi Uji Anova Satu Arah Sama Subyek	42
5.6	Hasil LSD (<i>Post Hoc Tests</i>)	42
BAB 6 PEMBAHASAN		45
BAB 7 KESIMPULAN DAN SARAN		
7.1	Kesimpulan	53
7.2	Saran	53
DAFTAR PUSTAKA		
LAMPIRAN		

DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 4.1 Langkah Perlakuan dan Pengambilan Serum pada Penelitian	41
Tabel 5.1 Hasil Pengukuran OD IgG dari Serum Mencit	37
Tabel 5.2 Data rata-rata dan simpangan baku OD IgG mingguan	38
Tabel 5.3 Hasil Uji Kolmogorof-Smirnov Data Variabel OD IgG berdasarkan kelompok perlakuan	40
Tabel 5.4 Hasil Nilai Koefisien <i>Hotelling's Trace</i> antar waktu pengambilan serum	40
Tabel 5.5 Hasil analisis univariat (<i>test of between-subjects effects</i>) untuk kelompok perlakuan	40
Tabel 5.6 Hasil analisis LSD variabel antar ketiga kelompok perlakuan (<i>pairwise comparisons</i>)	40
Tabel 5.7 Hasil Nilai Koefisien <i>Hotelling's Trace</i> antar variabel waktu dan variabel perlakuan	42
Tabel 5.8 Hasil Analisis Respon Imun IgG dengan Variabel Waktu Dengan antar Variabel Perlakuan	43
Tabel 5.9 Hasil <i>Least Significant Difference (Post Hoc Tests)</i>	43

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 2.1 Bentuk-bentuk <i>T. gondii</i> (A :Takizoit, B: Ookista)	6
Gambar 2.2 Bentuk <i>T. gondii</i> dalam jaringan otak (A) dan dalam otot jantung (B)	7
Gambar 2.3 Siklus Hidup <i>Toxoplasma gondii</i>	8
Gambar 3.1 Skema Kerangka Konseptual Penelitian Imunisasi SPTAg	23
Gambar 3.2 Skema Kerangka Konseptual Penelitian Imunisasi SPTAg dengan CT	24
Gambar 5.1 Grafik rata-rata OD IgG mingguan	38

DAFTAR SINGKATAN

ADCC	: Antigen Dependent Cell Cytotoxicity
APC	: Antigen Presenting Cell
cAMP	: Cyclic Adenosine Monophosphate
CD	: Cluster of Differentiation
CT	: Cholerae Toxin
Ct A/B	: Cholerae Toxin Subunit A/B
DC ₂	: Dendritic Cell subset 2
DNA	: Deoxyribo Nucleat Acid
ELISA	: Enzyme Linked Immunosorbent Assay
ESA	: Exreted-Secreted Antigen
FcR	: Receptor for Immunoglobulin Fragment
GM	: Granulocyte, Macrophage
GRA	: Dense Granule Antigen
IgA	: Immunoglobulin A
IgG	: Immunoglobulin G
IgM	: Immunoglobulin M
IL	: Interleukin
MHC	: Major Histocompatibility Complex
MIC	: Micronema
NK	: Natural Killer
OD	: Optical Density
PBS	: Phospat Buffered Saline
PEF	: Penetration Enhancing Factor
ROP	: Rhoptries Antigen
SAG	: Surface Antigen
SPTAg	: Solubel Protein Antigen
Th ₀	: T-helper cell precursor
Th ₁	: T-helper cell subset 1
Th ₂	: T-helper cell subset 2

DAFTAR LAMPIRAN

- Lampiran 1. Skema Penelitian
- Lampiran 2. Statistik Deskriptif
- Lampiran 3. Uji Normalitas Distribusi Data
- Lampiran 4. Uji Faktorial Sama Subyek PBS
- Lampiran 5. Uji Faktorial Sama Subyek SPTAg
- Lampiran 6. Uji Faktorial Sama Subyek SPTAg + CT
- Lampiran 7. Uji Faktorial Sama Subyek Waktu dan Perlakuan
- Lampiran 8. Uji Faktorial Sama Subyek Antar Waktu dan Antar Perlakuan
- Lampiran 9. Uji Anova Satu Arah Sama Subyek
- Lampiran 10. Uji *Least Significant Difference* (LSD)
- Lampiran 11. Foto Hasil Penelitian

BAB I

PENDAHULUAN



1.1 Latar Belakang

Toxoplasmosis merupakan penyakit infeksi yang disebabkan oleh protozoa *Toxoplasma gondii* (*T. gondii*). Penyakit ini ditemukan di seluruh dunia dan menginfeksi unggas dan mamalia, termasuk manusia (Levine, 1995). Pada manusia, *T. gondii* dapat menyebabkan infeksi akut maupun kronis dengan angka prevalensi antara 15% – 85% (Dachlan, 1996). Infeksi diawali dari infeksi *T. gondii* pada permukaan mukosa usus halus kemudian menyebar ke seluruh tubuh. Pada hospes dengan status imunitas yang baik tidak akan menimbulkan gejala (asimtomatis), tetapi bila status imunitas hospes yang kurang baik maka akan menimbulkan gejala (simptomatis) yang ringan sampai dengan berat, seperti pada immunosupresi pada penderita AIDS (Remington *et al.*, 1995). Manifestasi yang mengkhawatirkan adalah terjadinya toksoplasmosis kongenital yang terjadi pada janin yang ditulari *T. gondii* dari ibunya. (Darcy and Santoro, 1994; Robert and Janovy, 2000), sehingga pada masa ini dapat terjadi abortus spontan, lahir mati, lahir prematur atau lahir dengan cacat permanen (Levine, 1995; Holliman, 1996; Smith, 1999; Haumont *et al.*, 2000).

Salah satu upaya preventif terhadap toxoplasmosis adalah dengan pemberian imunisasi. Imunisasi sangat bermanfaat dalam langkah penanggulangan dampak negatif toxoplasmosis, khususnya pada ibu hamil. Saat ini sedang dikembangkan berbagai teknologi pengembangan kandidat vaksin yang aman dan efektif (Bonefant, 2001). Prosedur imunisasi parasit saat ini belum cukup mampu menginduksi respon imun. Beberapa penelitian yang telah dilakukan di bidang veteriner, vaksin hidup yang digunakan kemungkinan dapat berubah menjadi virulen, dengan dasar ini maka dicari strategi imunisasi yang

aman untuk digunakan pada manusia, karena itu dikembangkan vaksin subunit dengan komposisi yang mendekati dengan vaksin hidup (Buxton, 1993). Beberapa kandidat vaksin toksoplasmosis yang diberikan secara parenteral dapat menstimulasi imunitas sistemik (Brinkmann *et al.*, 1993; Darcy *et al.*, 1992).

Beberapa imunogen yang menjadi fokus sebagai kandidat vaksin toxoplasmosis adalah antigen permukaan takizoit (*surface antigen*) yang disingkat SAG, antigen dari granula padat (GRA) serta ESA yang merupakan kumpulan protein GRA1-GRA8, antigen dari mikronema (MIC) maupun antigen rhoptri (ROP) dari *Toxoplasma gondii* (McLeod *et al.*, 1991; Darcy and Santoro, 1994; Debard *et al.*, 1996; Fischer *et al.*, 1996; Fischer *et al.*, 1998; Jacobs *et al.*, 1999; Haumont *et al.*, 2000; Prigione *et al.*, 2000; Velge - Roussel *et al.*, 2000; Vercammen *et al.*, 2000). Antigen SAG, ROP, GRA dan MIC *T. gondii* yang diisolasi secara bersama-sama disebut sebagai antigen protein solubel (SPTAg) (Cesbron-Delauw, 2000).

Pada hewan coba, antigen di atas dapat diaplikasikan baik secara oral, intramuskular, intraperitoneal maupun secara intranasal. Umumnya pemberian antigen diaplikasikan secara oral, intramuskular dan intraperitoneal, sedangkan secara intranasal belum pernah dilakukan (Debard *et al.*, 1996). Beberapa penelitian menyimpulkan aplikasi intranasal lebih baik daripada aplikasi oral karena sedikit terjadi risiko kerusakan antigen oleh karena degradasi dan dilusi. Pemberian Protein Solubel (SPTAg) banyak gagal menstimulasi respon imun karena diaplikasikan secara oral (Holmgren *et al.*, 1993). Dilaporkan pemberian imunisasi dengan parenteral jarang menginduksi respon imun mukosa, tetapi pada beberapa kasus imunisasi langsung pada permukaan mukosa akan tampak sangat baik menginduksi imunitas lokal dan secara bersamaan juga menginduksi

imunitas sistemik (Hazama *et al.*, 1993; Hirabayashi *et al.*, 1990; Wu and Russel, 1993).

Pengaplikasian antigen secara intranasal mempunyai kelemahan yakni lemahnya imunogenitas antigen yang dihasilkan (Debard *et al.*, 1996), sehingga diperlukan suatu bahan yang dapat meningkatkan imunogenitas antigen, bahan ini dikenal dengan istilah ajuvan (Williams *et al.*, 1999). Ajuvan mukosa yang sering digunakan peneliti adalah CT (*Cholerae Toxin* = Toksin Kolera). Toksin kolera (CT) terbukti mampu bertindak sebagai ajuvan mukosa dengan menstimulasi respon imun humoral pada mencit, dan diketahui dapat memperbaiki imunogenitas antigen yang diaplikasikan secara oral dan intranasal (Debard *et al.*, 1996; Douce *et al.*, 1997; Rappuoli *et al.*, 1999; Velge - Roussel *et al.*, 2000 dan Bonenfant *et al.*, 2001).

Beberapa penelitian telah dilakukan untuk melihat respon imun humoral berupa peningkatan titer imunoglobulin terhadap pemberian antigen-antigen di atas yaitu SAG (*Surface Antigen*) (Debard *et al.*, 1996), ROP (*Rhoptries Antigen*) dan GRA (*Dense Granule Antigen*) (Cesbron-Delauw *et al.*, 1996; Vercammen *et al.*, 2000), dan ESA yang merupakan kumpulan protein GRA (GRA1-GRA8) (Darcy and Santoro, 1994; Cesbron-Delauw *et al.*, 1996; Prigione *et al.*, 2000), namun penggunaan SPTAg terhadap *T. gondii* secara lengkap masih belum banyak dilakukan (Prigione *et al.*, 2000).

Salah satu respon imun yang timbul pada tubuh secara humoral adalah dengan peningkatan titer IgG (Debard *et al.*, 1996). Respon imun humoral di dalam sirkulasi ditandai oleh peningkatan titer IgG terjadi pada fase awal sampai fase lanjut (Darcy and Santoro, 1994; Abbas *et al.*, 2000).

Evaluasi peningkatan titer IgG dengan imunisasi SPTAg sebagai imunogen dan CT sebagai ajuvan dengan aplikasi intranasal belum diketahui efikasinya. Bertolak dari latar belakang tersebut, maka perlu dilakukan penelitian

untuk mengetahui perbedaan gambaran respon imun humoral berupa peningkatan titer IgG yang terlihat dengan *Optical Density* (OD) IgG hewan coba terhadap pemberian SPTAg yang diaplikasikan secara intranasal dengan atau tanpa menggunakan ajuvan.

1.2 Rumusan Masalah

Mengingat belum ditemukannya vaksin yang efektif dan belum diketahuinya penggunaan imunisasi SPTAg dengan ajuvan CT maka penelitian ini perlu dilakukan sehingga disusun rumusan permasalahan sebagai berikut :

1. Apakah terdapat perbedaan respon imun berupa nilai *optical density* (OD) IgG hewan coba akibat pemberian SPTAg dengan atau tanpa ajuvan CT secara intranasal?
2. Apakah terdapat pengaruh waktu pengambilan serum terhadap respon imun berupa nilai OD IgG akibat pemberian SPTAg dengan atau tanpa ajuvan CT secara intranasal?
3. Apakah terdapat interaksi antara waktu pengambilan serum dengan pemberian SPTAg dengan atau tanpa ajuvan CT secara intranasal?

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan Umum

Penelitian ini secara umum bertujuan untuk memperoleh gambaran respon imun dengan pemberian SPTAg *T.gondii* dengan atau tanpa ajuvan CT secara intranasal dari serum hewan coba dengan waktu pengambilan yang sama.

1.3.2 Tujuan Khusus

Tujuan khusus penelitian ini adalah untuk :

1. Membuktikan terdapat perbedaan gambaran respon imun IgG mencit setelah imunisasi SPTAg *T. gondii* yang diaplikasikan secara intranasal dengan atau tanpa menggunakan ajuvan CT.
2. Membuktikan terdapat pengaruh waktu terhadap gambaran respon imun IgG mencit setelah imunisasi SPTAg *T. gondii* yang diaplikasikan secara intranasal dengan atau tanpa menggunakan ajuvan CT.
3. Membuktikan terdapat interaksi antara waktu imunisasi dan perlakuan pada respon imun IgG mencit setelah imunisasi SPTAg *T. gondii* yang diaplikasikan secara intranasal dengan atau tanpa menggunakan ajuvan CT.

1.4 Manfaat Penelitian

1.4.1 Manfaat Teoritis

Hasil penelitian ini diharapkan bermanfaat untuk pengembangan ilmu dalam menjelaskan respon imun IgG dengan SPTAg setelah pemberian subunit vaksin *T. gondii* dan ajuvan CT.

1.4.2. Manfaat Aplikatif

Dari segi penerapan konsep imunoparasitologi, hasil penelitian ini diharapkan bermanfaat sebagai model vaksin subunit yang dapat digunakan sebagai alternatif pada imunisasi toksoplasmosis.

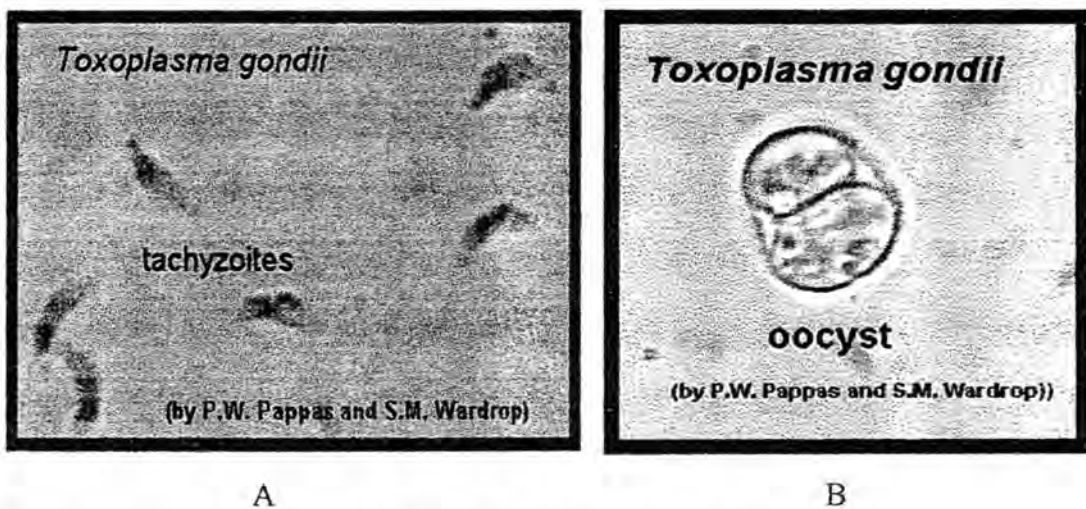
BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Sifat-sifat Biologis *T. gondii*

2.1.1 Morfologi dan Siklus Hidup *T. gondii*

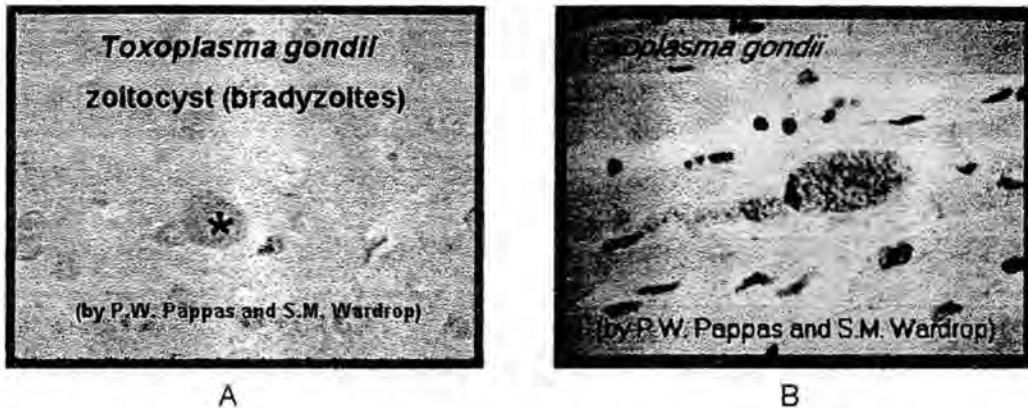
Toxoplasma gondii mempunyai tiga bentuk perkembangan yaitu : takizoit, kista jaringan dan ookista. Takizoit ditemukan pada infeksi akut dan dapat memasuki tiap sel yang berinti. Bentuk takizoit menyerupai bulan sabit dengan satu ujung yang runcing dan ujung yang lain berbentuk agak bulat. Panjang takizoit 4-8 μm , motil, membelah dengan cepat dan mempunyai satu inti yang letaknya agak di tengah dan takizoit pada manusia adalah parasit obligat intraseluler. Organel-organel takizoit terdiri dari conoid, micronemes, granula-granula terdensasi, nukleus dan roptries. Takizoit terwarnai dengan baik dengan pewarnaan Wright dan Giemsa (Dubey, 2003).



Gambar 2.1 Bentuk-bentuk *T. gondii* (A :Takizoit, B: Ookista)
(Biosci.ohio-state.edu/-parasite, 2003)

Kista jaringan dibentuk di dalam sel hospes bila takizoit yang membelah telah membentuk dinding. Kista jaringan memiliki diameter lebih dari 200 μm , yang berisi ratusan bradizoit. Di otak kista berbentuk lonjong atau bulat sedang di

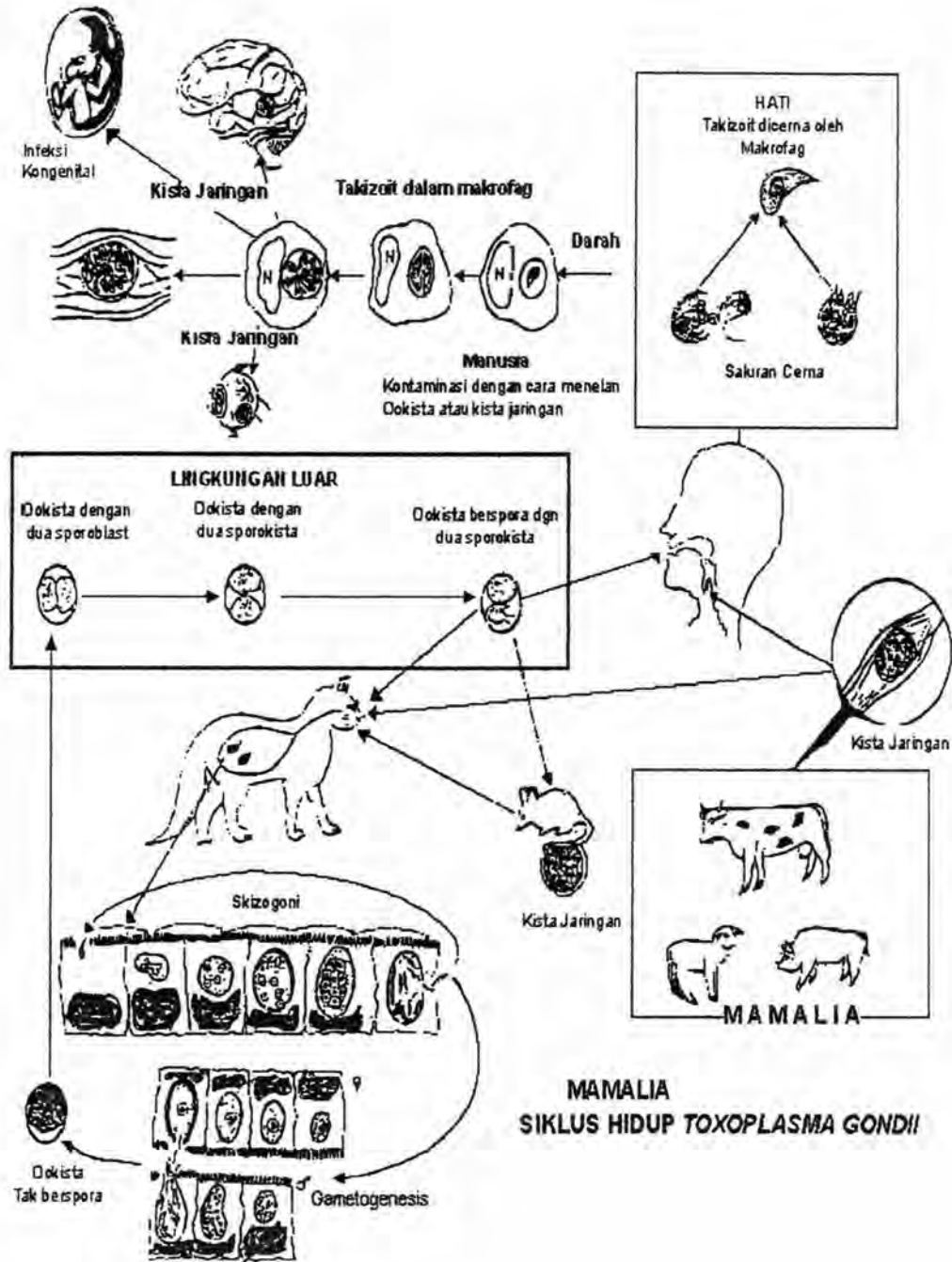
otot kista mengikuti bentuk sel otot. Ookista *Toxoplasma gondii* berukuran 12 x 10 μm , bentuk subsperikal (lonjong) dengan dinding tipis, setelah terjadi spora bentuk menjadi oval yang menghasilkan 2 sporokista, masing masing mengandung sporozoit yang terdapat di feses kucing. Spora muncul di luar tubuh kucing dan ookista infeksius dalam 1 hingga 5 hari setelah diekresikan (Dubey, 2003).



Gambar 2.2 Bentuk *T. gondii* dalam jaringan otak (A) dan dalam otot jantung (B) (Biosci.ohio-state.edu/-parasite, 2003)

Pada *Felidae*, siklus hidup *T. gondii* terjadi dalam dua stadium atau bentuk. Masing masing yaitu stadium aseksual dan seksual (Darcy and Santoro, 1994) serta bentuk enteroepitelial dan ekstraintestinal (Dubey *et al.*, 1998; Robert and Janovy, 2000). Pada hospes perantara hanya mengalami stadium aseksual maupun ekstraintestinal (Robert and Janovy, 2000). Hospes definitif dari *T. gondii* adalah hewan dalam keluarga *Felidae* khususnya kucing. Pada sel epitelium dari saluran usus hospes definitif tersebut *T. gondii* mengalami perkembangan aseksual (*schizogoni*) maupun seksual (*gametogoni*) yang diakhiri dengan terbentuknya ookista (Darcy and Santoro, 1994; Robert and Janovy, 2000). Setiap ookista yang dikeluarkan oleh hospes definitif akan mengalami sporulasi sehingga terbentuk dua sporokista yang masing masing berisi empat sporozoit. Ookista yang telah bersporulasi tersebut merupakan salah satu stadium infeksius yang dapat menginfeksi hospes antara seperti burung,

mamalia dan juga manusia. Bentuk ookista parasit akan mampu bertahan lama dalam lingkungan luar (Levine, 1995).



Gambar 2.3 Siklus hidup *Toxoplasma gondii* (Dubey, 2003)

Tertelannya ookista yang telah bersporulasi akan mengakibatkan terjadinya ekskistasi. Ekskistasi merupakan proses terlepasnya sporozoit dari ookista karena efek mekanik dan enzimatis didalam saluran pencernaan hospes. Sporozoit yang keluar dari ookista akan menginfeksi sel epitel usus dan disebut takizoit (Robert and Janovy, 2000). Selanjutnya takizoit akan dapat menyebar baik dalam organ pencernaan (saluran usus) maupun berbagai organ lain diseluruh tubuh melalui pembuluh limfe maupun pembuluh darah (Susanto dkk, 1999).

Pada hospes perantara, *T. gondii* hanya mengalami perkembangan aseksual dengan dua bentuk parasit yang berbeda. Masing masing adalah bentuk takizoit dan kista bradizoit. Takizoit merupakan bentuk multiplikatif aktif dan cepat yang berkaitan dengan manifestasi klinis toksoplasmosis akut. Bradizoit merupakan stadium multiplikatif lambat dan non invasif dengan membentuk kista yang berkaitan dengan infeksi kronis (Darcy and Santoro, 1994; Robert and Janovy, 2000).

2.2 Patogenesis Toksoplasmosis pada Manusia

Pada manusia infeksi oleh *T. gondii* dapat terjadi dengan dua cara. Pertama tertelannya ookista infeksi melalui makanan yang terkontaminasi misalnya sayur atau buah buahan. Ookista infeksi tersebut selanjutnya mengalami ekskistasi dan takizoit akan difagositosis oleh makrofag di hati, di dalam makrofag takizoit mengalami multiplikasi cepat, kemudian bila sudah penuh dengan takizoit maka makrofag akan pecah dan takizoit menyebar melalui pembuluh darah dan limfe, secara aktif akan menginvasi sel-sel pada jaringan atau organ lain (Darcy and Santoro, 1994; Dubey *et al.*, 1998; Robert and Janovy, 2000).

Jalur yang digunakan untuk invasi oleh takizoit setelah melewati sel epitel usus adalah melalui kelenjar limfe menuju limfonodi mesenterika dan pembuluh darah menuju parenkim hepar (Susanto dkk, 1999; Robert and Janovy, 2000). Jalur tersebut akan dipergunakan oleh takizoit untuk menyebar lebih jauh ke berbagai organ atau jaringan terutama otot jantung, retina mata dan otak. Pada ketiga organ tersebut parasit dapat hidup dan berkembang relatif lama sebagai bradizoit yang akan mengakibatkan kerusakan atau gangguan fungsi jaringan maupun organ (Dubey *et al.*, 1998; Robert and Janovy, 2000).

Bentuk penularan kedua terjadi karena tertelannya kista jaringan yang berisi banyak bradizoit dalam daging dan organ hewan. Bradizoit akan menginfeksi sel epitel usus dan berubah menjadi takizoit atau tetap dalam bentuk bradizoit tergantung status imun hospes. Bentuk bradizoit akan mengalami multiplikasi yang sangat lambat dan akan kembali membentuk kista jaringan atau organ individu yang terinfeksi. Pada status imun yang lemah bradizoit akan berubah menjadi takizoit akan mengalami multiplikasi cepat dan invasi aktif (Dubey *et al.*, 1998).

Takizoit mampu menginfeksi semua jenis sel yang berinti termasuk makrofag (Darcy and Santoro, 1994). Takizoit yang telah menginfeksi sel, akan hidup dalam suatu vakuola parasitoforus (*parasitophorus vacuole*) sehingga tidak dapat fusi dengan kompartemen intrasel lainnya (McLeod *et al.*, 1991; Holliman, 1996; Robert and Janovy, 2000). Hal ini menyebabkan parasit mampu bertahan hidup untuk jangka waktu lama di dalam sel dan sewaktu waktu dapat reaktivasi (Robert and Janovy, 2000).

Bradizoit yang membentuk kista dalam jaringan akan mampu mengalami reaktivasi menjadi bentuk takizoit apabila kondisi memungkinkan. Perubahan dari takizoit menjadi bradizoit atau sebaliknya dipengaruhi oleh status imun individu (Darcy and Santoro, 1994; Denkers and Gazzinelli, 1998). Pada saat

respon imun individu optimal maka takizoit akan segera mengalami eliminasi ataupun berubah menjadi bradizoit. Reaktivasi dapat terjadi apabila sistem imun individu menjadi lemah baik, karena menurunnya titer imunoglobulin yang spesifik maupun rendahnya interferon gama ($IFN\gamma$) atau *alfa tumor necrosis factor* ($TNF\alpha$) (Darcy and Santoro, 1994; Denkers and Gazzinelli, 1998; Susanto dkk, 1999).

Infeksi primer, reinfeksi maupun reaktivasi diindikasikan adanya takizoit dalam sistem sirkulasi dan menyebar ke sel atau jaringan lain. Kondisi tersebut sangat rawan untuk terjadi infeksi fetomaternal pada individu yang sedang hamil. Resiko tersebut disebabkan kemampuan takizoit untuk menembus barrier plasenta dan menginfeksi janin (Darcy and Santoro, 1994; Robert and Janovy, 2000), infeksi tersebut mengakibatkan beragam manifestasi klinis seperti aborsi spontan, *still birth*, hidrosefalus, kalsifikasi intraserebral, retinakoroiditis maupun retardasi mental (Holliman, 1996; Smith, 1999; Haumont *et al.*, 2000; Robert and Janovy., 2000). Sebaliknya manifestasi klinis dari toksoplasmosis pada individu dewasa umumnya asimtomatis meskipun dapat pula simtomatis non spesifik (Robert and Janovy, 2000). Gejala klinis toksoplasmosis pada individu dewasa tersebut berupa nyeri serta pembengkakan limfonodi servikalis dan inguinalis, sakit kepala, demam, nyeri otot dan anemia (Holliman, 1996; Robert and Janovy, 2000).

2.3 Respon Imun Humoral terhadap Toksoplasmosis

Pada sistem sirkulasi yang berperan utama dalam jangka waktu yang lama adalah IgG (Darcy and Santoro, 1994). Respon IgG mengalami peningkatan setelah dilakukan vaksinasi intranasal pada mencit CBA/J dengan menggunakan antigen permukaan *T. gondii*. Peningkatan titer IgG tersebut ternyata mampu meningkatkan resistensi mencit terhadap infeksi *T. gondii*

secara *in vivo*. Pada mencit (*Mus musculus*) strain BALB/c yang mengalami defisiensi limfosit B ternyata sangat peka terhadap infeksi *T. gondii* (Debard et al., 1996).

Respon imun pada toksoplasmosis ditunjukkan dengan takizoit yang berikatan dengan antibodi yang membentuk kompleks antigen – antibodi, kemudian difagositosis dengan perantaraan reseptor Fc (FcR) sehingga vakuola parasitoforus akan bergabung (*fusi*) dengan lisosom, dan mengakibatkan destruksi takizoit dalam sel (McLeod et al., 1991). Komplemen, sel fagositik maupun sel sitotoksik dalam sirkulasi dapat mengadakan destruksi pada takizoit (Darcy and Santoro, 1994).

Pada sistem sirkulasi, respon imun humoral dalam jangka waktu yang lama diperantarai oleh IgG (Darcy and Santoro, 1994). Respon oleh IgG dapat bekerja dengan mengaktifasi komplemen, memperantarai fagositosis yang dilakukan oleh sel mononuklear maupun menginduksi sitotoksik yang dilakukan oleh sel NK (Abbas et al., 2000).

Pada mencit BALB/c, profil imun humoral adaptif (khususnya IgG) yang muncul sebagai respon terhadap infeksi *T. gondii* dipengaruhi oleh fase infeksi. Apabila dievaluasi pada fase akut (21 hari setelah infeksi), respon imun IgG sudah tampak (Nguyen et al., 1998). Sebaliknya pada fase kronis (56 hari setelah infeksi), respon imun IgG masih dapat dilihat dan terus dipertahankan sampai 325 hari (Nguyen et al., 1998).

2.4 Respon Imun Seluler pada Toksoplasmosis

Beberapa peneliti menyatakan bahwa secara umum respon imun seluler cukup dominan dalam melindungi hospes dari infeksi maupun reaktivasi *T. gondii* terutama bentuk intraseluler (Darcy and Santoro, 1994; Debard et al., 1996; Denkers and Gazzinelli, 1998; Zhang and Denkers, 1999; Prigione et al.,



2000). Aktivasi respon imun seluler tidak hanya terbatas pada limfosit T sitotoksik (sel T/CD8⁺) tetapi juga sel Th (CD4⁺), serta terdapat reaktivasi bradizoit menjadi takizoit serta peningkatan kerusakan jaringan otak dan retina mata akibat pemberian anti CD8⁺ pada mencit yang mengalami infeksi kronis. Fakta tersebut menunjukkan efek langsung dari defisiensi sel T/CD8⁺ dalam proteksi terhadap toksoplasmosis (Gazzinelli *et al.*, 1994).

Peran sistem imun seluler dapat terjadi baik secara langsung (proses sitolitik atau fagositik) ataupun secara tidak langsung diperankan oleh limfosit T sitotoksik dan sel fagositik. Peran secara tidak langsung dalam memberikan proteksi terhadap toksoplasmosis terjadi melalui sitokin yang dihasilkan oleh sel-sel yang terlibat dalam respon imun seluler (Gazzinelli *et al.*, 1994). Sitokin yang sangat berperan dalam resistensi dan proteksi terhadap toksoplasmosis adalah IFN γ dan TNF α (Gazzinelli *et al.*, 1994; Kasper and Buzoni-Gatel, 2001).

Takizoit secara umum juga akan mengaktivasi sel penyaji antigen (APC) profesional seperti sel dendritik, makrofag maupun limfosit B. Aktivitas tersebut mengakibatkan teraktivasinya sel Th₀ (sel Th₁ ataupun sel Th₂) serta sel pembunuh alamiah atau sel NK. Selanjutnya sel Th₁ dan APC bersama-sama mengaktivasi sel T/CD8⁺. Aktivasi Th₀, sel T/CD8⁺ dan sel NK dilakukan oleh APC melalui IL 12 (sel dendritik, makrofag). Adapun sel NK, sel Th₁, sel T/CD8⁺ yang teraktivasi oleh IFN γ maupun TNF α (Denkers and Gazzinelli, 1998).

Kedua jenis sitokin tersebut baik secara tunggal maupun bersama-sama akan mendapat menghambat multiplikasi dan mengaktivasi bradizoit sehingga meningkatkan resistensi terhadap toksoplasmosis (Scarton-Kersten *et al.*, 1996; Ceravolo *et al.*, 1999). Adapun IFN γ memiliki kemampuan dalam induk serta terjadi ternyata menginduksi. Disisi lain IFN γ juga berperan dalam induksi

terjadinya *switching* dari IgM menjadi IgG yang sangat esensial pada respon imun terhadap toksoplasmosis (Abbas *et al.*, 2000).

Peranan berbagai sitokin dalam resistensi atau proteksi terhadap toksoplasmosis juga telah dilaporkan. Sitokin lain yang juga dinyatakan memiliki peranan tersebut diantaranya adalah interleukin 10 atau IL 10 (Neyer *et al.*, 1997), IL 4 dan IL 5 (Zhang and Denkers, 1999). Peranan IL 12 dalam proteksi terhadap toksoplasmosis juga telah dibuktikan (Zhang and Denkers, 1999).

Kedua jenis tersebut baik secara tunggal maupun bersamaan akan dapat menghambat multiplikasi dan mengaktivasi makrofag untuk melakukan deskruksi takizoit serta mencegah reaktivasi brodizoit sehingga meningkatkan resistensi terhadap toksoplasmosis (Vercammen, 2000)

2.5 Imunogen dari *T. gondii*

Imunogen merupakan semua antigen yang mampu menstimulasi timbulnya respon imun secara aktif dari suatu individu, sedangkan antigen yaitu bahan asing yang masuk ke dalam tubuh individu dan tidak selalu menginduksi respon imun (Elgert, 1996). Lebih dari seratus macam antigen telah dikarakterisasi dari *T. gondii*. Beberapa antigen tersebut telah diketahui dapat bertindak sebagai imunogen dan telah dicoba dalam berbagai percobaan vaksinasi (McLeod *et al.*, 1991).

Imunogen dari *T. gondii* sedang intensif dipelajari untuk dapat dijadikan sebagai kandidat bahan vaksin yaitu, SAG, GRA, ROP, dan MIC. Setiap kelompok masih memiliki beberapa jenis antigen yang lebih lanjut digolongkan menjadi subkelompok berdasar berat molekul proteinnya.

2.6 Antigen Permukaan *T. gondii*

Antigen ini terdiri dari SAG1-SAG6 yang bermanfaat dalam proses perlekatan dengan sel hospes yang akan diinfeksi (Tomavo, 1996; Susanto *et al.*, 1999; Black and Boothroyd, 2000). Perlekatan yang terjadi antara takizoit dengan sel hospes akan memudahkan adaptasi ujung anteriornya terhadap sel hospes untuk dapat secara aktif melakukan penetrasi (Black and Boothroyd, 2000). Penggunaan SAG, terutama SAG1 sebagai kandidat bahan vaksin telah dilaporkan oleh beberapa peneliti pada berbagai sistem percobaan yang berbeda. Antigen ini merupakan protein yang hanya ditemukan pada bentuk takizoit, dan terdistribusi secara homogen di permukaan takizoit yang menyusun sekitar lima persen dari total protein takizoit. (McLeod *et al.*, 1991). Beberapa penelitian yang telah dilaporkan antara lain oleh Debard *et al.* (1996), Fischer *et al.* (1996), Velge – Roussel *et al.* (2000) dan Bonenfant *et al.* (2001).

Munculnya antibodi anti SAG akan mampu mengenali SAG terutama SAG1 maka antibodi tersebut akan menghalangi perlekatan takizoit pada sel target yang akan diinfeksi baik di mukosa saluran usus maupun dalam sistem sirkulasi. Halangan tersebut karena permukaan takizoit yang dikenali akan diikat oleh fragmen Fab antibodi sehingga takizoit tidak dapat menempel pada reseptor yang dikehendaki di permukaan sel berinti. Sel berinti yang menjadi target takizoit dalam sistem sirkulasi adalah monosit, sel dendritik dan netrofil (paling dominan), limfosit dan makrofag serta sel berinti lainnya pada mukosa dan organ. Konsekuensi dari kompleks ikatan takizoit-antibodi (IgG) yaitu akan terjadi induksi ADCC atau opsonisasi melalui bagian Fc dari antibodi dengan reseptor Fc pada sel efektor sistem imun maupun aktivasi reaksi komplemen melalui jalur klasik oleh IgG (Channon *et al.*, 2000).

2.7 Antigen dari Mikronema (MIC) dan Rhoptri (ROP)

Protein dari mikronema dan rhoptri disekresikan selama terjadinya proses penetrasi ke dalam sel dan proses awal pembentukan vakuola parasitoforus. Fungsi protein mikronema secara pasti dan detil belum seluruhnya diketahui (Fourmaux *et al.*, 1996), meskipun demikian peneliti lain telah melaporkan beberapa fungsi yang berkaitan dengan proses penetrasi (McLeod *et al.*, 1991; Fischer *et al.*, 1996; Fourmaux *et al.*, 1996; Dubey *et al.*, 1998; Susanto *et al.*, 1999; Black and Boothroyd, 2000). Pada beberapa penelitian antigen MIC dan ROP dinyatakan sebagai faktor pemacu penetrasi *penetration enhancing factor* (PEF) yang membantu meningkatkan kemampuan dan kecepatan penetrasi takizoit *T. gondii* ke dalam sel hospes (McLeod *et al.*, 1991; Fischer *et al.*, 1996; Fourmaux *et al.*, 1996; Dubey *et al.*, 1998; Susanto *et al.*, 1999; Black and Boothroyd, 2000).

Antigen ROP juga diperlukan untuk modifikasi awal proses pembentukan vakuola parasitoforus (Cesbron – Delauw *et al.*, 1996; Susanto *et al.*, 1999; Black dan Boothroyd, 2000). Modifikasi pembentukan vakuola parasitoforus diperlukan agar vakuola tersebut tidak mengalami asidifikasi dan fusi dengan kompartemen seluler lain seperti lisosom sehingga takizoit dapat terus melakukan penetrasi dan vakuola tetap terbentuk tanpa dirusak oleh sel hospes (Dubey *et al.*, 1998; Susanto *et al.*, 1999; Black and Boothroyd, 2000).

Penggunaan MIC sebagai kandidat vaksin dilaporkan oleh Channon *et al.* (1999) yang menyatakan bahwa adanya antibodi anti MIC1 atau MIC2 menyebabkan hambatan penetrasi takizoit pada kultur monosit secara *in vitro*. Menurut Vercammen *et al.* (2000) ROP dapat ditemukan pada bentuk takizoit maupun bradizoit. Antigen rhoptri yang telah dicoba digunakan sebagai bahan vaksin dan mampu menstimulasi peningkatan IgG adalah antigen ROP2 (Vercammen *et al.*, 2000). Fischer *et al.* (1996) dan Bourguin *et al.* (1998) juga

menyatakan bahwa ROP2 – ROP4 dapat menginduksi munculnya respon imun adaptif pada mencit.

2.8 Antigen Beredar dari Granula Padat (GRA)

Antigen protein GRA dapat ditemukan di bagian bawah membran luar, vakuola parasitoforus dan aparatus golgi (McLeod *et al.*, 1991). Antigen beredar atau antigen sekretori dan ekskretori dari organel granula padat (GRA). Terdapat delapan kelompok GRA (GRA1-GRA8) yang telah diketahui sampai saat ini (Cesbron – Delauw *et al.*, 1996; Black and Boothroyd, 2000). Kumpulan semua antigen GRA (dari GRA1 sampai GRA8) yang diisolasi dari takizoit *T. gondii* umumnya dikenal dengan nama antigen beredar (ESA) (Cesbron-Delauw, 2001). Secara umum antigen tersebut dapat ditemukan pada bentuk takizoit, bradizoit maupun dinding sel ookista (McLeod *et al.*, 1991).

Fungsi GRA secara umum adalah sebagai protein untuk modifikasi akhir dan penyempurna vakuola parasitoforus (Black and Boothroyd, 2000). Modifikasi ini diperlukan agar vakuola parasitoforus dapat menjadi tempat yang sesuai dan mendukung perkembangan takizoit maupun bradizoit selama kehidupan intraseluler. Protein antigen ini disekresikan setelah vakuola parasitoforus terbentuk atau setelah sekresi protein ROP (Black and Boothroyd, 2000).

Seperti halnya SAG, antigen GRA baik GRA1, GRA2, GRA4 maupun GRA7 telah dievaluasi dan dilaporkan memiliki potensi sebagai kandidat bahan vaksin. Beberapa penelitian yang telah dilaporkan oleh Cesbron-Delauw *et al.* (1996), Fischer *et al.* (1996), Fischer *et al.* (1998), Jacobs *et al.* (1999); Prigione *et al.* (2000) dan Vercammen *et al.* (2000). Vercammen *et al.* (2000) adalah tentang kemampuan GRA7 sebagai vaksin untuk menginduksi peningkatan titer IgG terhadap *T. gondii* dengan teknologi vaksin DNA yang mengkode gen penyandi GRA7.

2.9 Antigen SPTAg dari *T. gondii*

Secara keseluruhan, SPTAg merupakan total protein terlarut yang dapat disekresi atau diekskresikan keluar dari takizoit *T. gondii* yang terdiri atas campuran semua antigen GRA, ROP dan MIC (Cesbron-Delauw, 2001¹), sehingga SPTAg mampu menginduksi antibodi spesifik GRA, SAG, MIC dan ROP akan memberikan implikasi yang menguntungkan. Keuntungan yang terkait dengan proteksi terhadap infeksi takizoit adalah adanya *multipathway* dalam mencegah penyebaran takizoit dan kerusakan jaringan akibat toksoplasmosis. Terbentuknya antibodi terhadap keempat protein toksoplasma akan menyebabkan terjadinya destruksi takizoit ekstra dan intraseluler oleh IgG. Pada sistem sirkulasi yang berperan dominan dalam pertahanan adalah IgG (Cesbron-Delauw, 2001¹).

Penggunaan SPTAg dilaporkan telah digunakan secara subkutan yang dapat menginduksi pembentukan imunoglobulin spesifik terhadap infeksi *T. gondii* (Alexander *et al.*, 1996). Imunisasi melalui rute subkutan dengan SPTAg dari takizoit galur RH dengan ajuvan IL 12 juga menginduksi respon imun spesifik pada mencit BALB/c (Yap *et al.*, 1998).

2.10 Ajuvan Toksin Kolera (CT)

Ajuvan merupakan substansi yang digunakan atau dikombinasikan dengan antigen tertentu dan mampu meningkatkan respon imun individu terhadap suatu antigen yang lemah imunogenitasnya menjadi lebih tinggi atau kuat dibanding antigen tersebut (Elgert, 1996; Singh and O'Hagan, 1999). Pemilihan ajuvan dapat didasarkan pada target sistem imun atau efektor dari sistem imun yang dikehendaki. Secara umum ajuvan bekerja melalui beberapa mekanisme. Cara kerja ajuvan tersebut diantaranya memperlambat pelepasan antigen, menginduksi migrasi sel penyaji antigen seperti makrofag dan sel

dendritik, meningkatkan pengambilan dan penyajian antigen oleh sel penyaji antigen (Elson and Dertzbaugh, 1994). Ajuvan juga dapat bekerja dengan merubah jalur proses antigen pada molekul MHC, menginduksi perubahan fisiologi intraseluler, stimulasi produksi sitokin dan diferensiasi serta proliferasi limfosit ataupun menginduksi ekspresi molekul kostimulator tertentu untuk transduksi sinyal (Elson and Dertzbaugh, 1994; Giuliani *et al.*, 1998 dan Abbas *et al.*, 2000).

Pada sistem imun mukosa, ajuvan yang dapat digunakan adalah toksin kolera (CT). Toksin kolera mampu memperbaiki dan meningkatkan respon imun mukosa terutama pada antigen yang memiliki imunogenitas lemah (Elson and Dertzbaugh, 1994; Debard *et al.*, 1996; Rappuoli *et al.*, 1999; Williams *et al.*, 1999; Martin *et al.*, 2000). Pada beberapa penelitian penggunaan CT dengan aplikasi intranasal ternyata mampu memperbaiki dan meningkatkan respon imun terhadap antigen spesifik yang diberikan (Hartman *et al.*, 1999; Martin *et al.*, 2000). Diantara penelitian tersebut adalah pemberian SAG bersama CT dengan aplikasi intranasal pada mencit menimbulkan respon imun IgG yang lebih tinggi dibanding tanpa ajuvan, puncak IgG dengan pemberian SAG dengan atau tanpa CT pada hari ke-47 (Debard *et al.*, 1996).

2.10.1 Respon yang Ditimbulkan Toksin Kolera

Toksin kolera dihasilkan oleh *Vibrio cholera*. Toksin kolera terdiri atas dua subunit protein, yaitu subunit A dan subunit B (Sears and Kaper, 1996). Subunit B dari CT (CtB) merupakan protein pentamer yang akan berikatan dengan reseptor GM₁ (Fukuta *et al.*, 1988; Sears and Kaper, 1996; Williams *et al.*, 1999; Martin *et al.*, 2000; Bowman and Clements, 2001; Wimer-Mackin *et al.*, 2001). Menurut Fukuta *et al.* (1988) dan Williams *et al.* (1999) CT juga dapat berikatan dengan afinitas yang lemah pada reseptor GD_{1b}. Konstanta disosiasi antara CT dengan reseptor GM₁ sebesar $7,3 \times 10^{-10}$ M (Williams *et al.*, 1999).

Reseptor GM_1 bersifat ubiquitus (*ubiquitous*) yang artinya ditemukan pada semua sel eukaryot (Sears and Kaper, 1996; Williams *et al.*, 1999). Perlekatan antara reseptor GM_1 dengan CtB memungkinkan subunit A dari CT (CtA) berinteraksi dengan sel target dan menstimulasi berbagai perubahan biokimiawi intraseluler yang termanifestasi dengan perubahan fisiologis sel. Secara alamiah, pada saluran usus CT akan menyebabkan terjadinya diare yang dipicu oleh CtA (Lebens *et al.*, 1996; Sears and Kaper, 1996; Rappuoli *et al.*, 1999).

Interaksi CT dengan sel epitel menginduksi cAMP yang tinggi oleh subunit A_1 dari Ct (CtA_a). Hal ini menyebabkan hambatan proliferasi limfosit T secara keseluruhan, sehingga terjadi supresi respon imun IgG pada fase awal (Ryan *et al.*, 2001; Lopez *et al.*, 2000). Kolera Toksin tetap akan berikatan dengan sel Th, interaksi limfosit T khususnya sel Th₁, menyebabkan terjadinya apoptosis karena sel Th₁ lebih peka terhadap kenaikan cAMP intraseluler (Yamamoto *et al.*, 2001). Sebaliknya pada sel Th₂ tidak terjadi apoptosis, bersama dengan IL 4 menginduksi polarisasi sel Th₀ menjadi sel Th₂ (Sallusto *et al.*, 1998; Kalinski *et al.*, 2001). Sel Th₂ akan mengaktivasi limfosit B, IL 4 akan menginduksi limfosit B untuk membentuk IgG, sedangkan IL 13 dan IL 13R yang banyak ditemukan pada makrofag yang akan menstimulasi pembentukan IgG (Elgert, 1996).

Pada bidang imunologi, CT dapat dimanfaatkan sebagai adjuvan mukosa yang potensial (Rappuoli *et al.*, 1999; Williams *et al.*, 1999; Martin *et al.*, 2000; Millar *et al.*, 2001). Respon imun seluler pada penggunaan CT dengan antigen ovalbumin pada mencit lebih dominan menstimulasi sel Th₂ (Douce *et al.*, 1997). Potensi tersebut didasarkan pada beberapa laporan penggunaan CT sebagai adjuvan untuk berbagai jenis antigen. Pada induksi respon imun CT, sitokin yang lebih dominan mengalami peningkatan adalah IL 1, IL 3, IL 4, IL 5, IL 6, IL 10, IL

13, TGF β (*tumor growth factor beta*) serta IL 12 secara parsial (Ryan *et al.*, 1999; Staats and Ennis, 1999).

Secara umum daya ajuvan holotoksin CT lebih kuat dibanding CtB, meskipun efek toksik yang ditimbulkan oleh CT juga lebih besar (Douce *et al.*, 1997; Rappuoli *et al.*, 1999). Efek ajuvan dari CtB (terutama dari produk komersial) disebabkan oleh adanya kontaminasi dari CtA. Kontaminan yang secara kuantitatif sangat kecil, tetapi secara biologis memiliki efek yang nyata dalam menginduksi sistem imun (Douce *et al.*, 1997).

2.11 Aplikasi Imunisasi Intranasal

Aplikasi imunisasi intranasal dipandang lebih menguntungkan dibanding parenteral maupun oral. Rute intranasal memiliki beberapa keuntungan yaitu kecilnya peluang degradasi antigen dan hanya memerlukan jumlah yang sangat kecil untuk induksi sistem imun dibanding rute intramuskular ataupun oral. Keunggulan lainnya yaitu lebih mudah dan nyaman dalam aplikasi karena tidak rumit dan menimbulkan rasa sakit pada individu yang diimunisasi (Debard *et al.*, 1996).

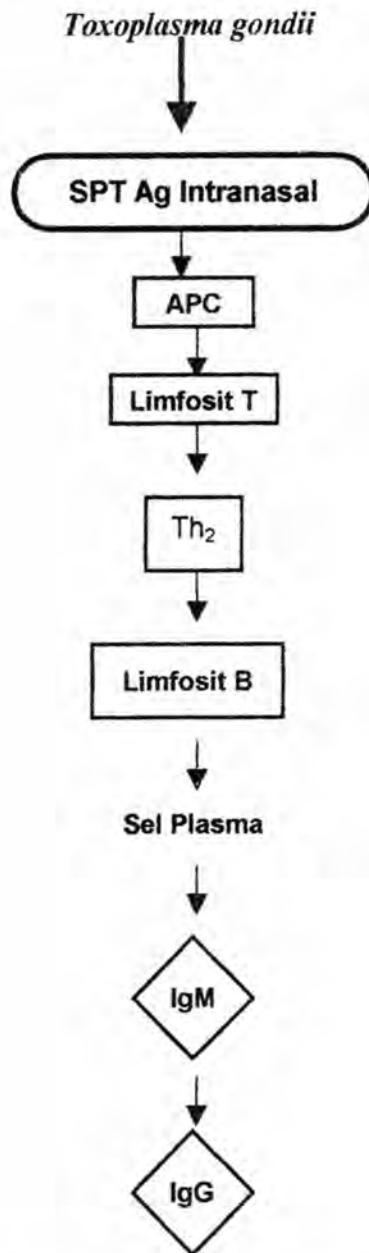
Aplikasi imunisasi melalui intranasal menggunakan antigen hemagglutinin virus influenza ternyata mampu menginduksi respon imun yang lebih tinggi dibanding melalui rute intramuskular (Barackman *et al.*, 1999). Pada mukosa rongga hidung mencit telah ditemukan komponen sistem imun seperti limfosit T, limfosit B dan APC (*antigen presenting cell*) (Hameleers, 1990; Sminia and Kraal, 1999). Adanya APC memungkinkan pemrosesan dan penyajian antigen untuk dikenali oleh limfosit. Kondisi tersebut memungkinkan timbulnya respon imun secara lokal pada mukosa hidung dan saluran respirasi atas maupun dalam sirkulasi darah. Pada mukosa hidung terdapat sel dendritik subset kedua (DC₂),

sel ini memiliki kecenderungan untuk menginduksi sel Th₂ (Pulendran *et al.*, 2001).

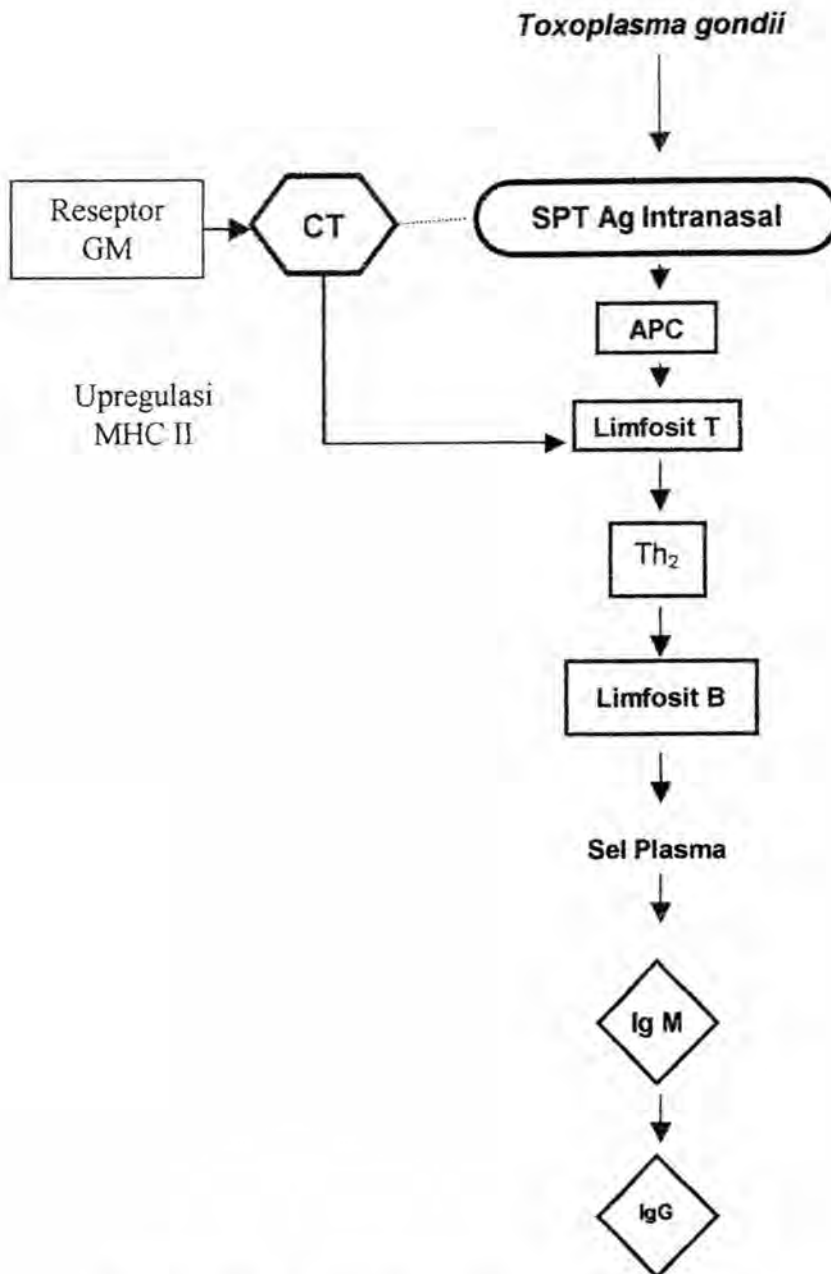
Imunisasi secara intranasal dapat membangkitkan respon imun adaptif sistemik. Induksi respon imun spesifik dalam sistem sirkulasi diawali dengan terjadinya migrasi sel dendritik dan limfosit teraktivasi dari mukosa hidung ke dalam peredaran darah melalui organ limfoid sekunder. Limfosit T maupun B yang teraktivasi dari mukosa hidung akan bermigrasi ke dalam sistem sirkulasi melalui kelenjar limfe servikalis posterior dan limpa (Brandtzaeg *et al.*, 1999; Sminia and Kraal, 1999). Kelemahan aplikasi intranasal kemungkinan berkaitan dengan resiko lemahnya imunogenitas antigen yang digunakan sehingga diperlukan penggunaan ajuvan mukosa yang dapat diaplikasikan secara intranasal (Debard *et al.*, 1996; Bonenfant *et al.*, 2001).

BAB 3 KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS

3.1 Kerangka Konseptual Pemikiran



Gambar 3.1 Skema Kerangka Konseptual Penelitian Imunisasi SPTAg



Gambar 3.2 Skema Kerangka Konseptual Penelitian Imunisasi SPTAg dengan Ajuvan CT

Toksoplasmosis pada manusia terjadi karena manusia yang merupakan hospes perantara terinfeksi oleh ookista infeksi, takizoit ataupun bradizoit *T. gondii*. Infeksi ini akan menginduksi munculnya respon imun humoral. Respon imun tersebut dapat terjadi pada sistem sirkulasi (sistemik) maupun permukaan mukosa, khususnya pada permukaan saluran usus (Kasper and Buzoni-Gatel, 2001).

Munculnya IgM pada awal infeksi baik infeksi primer, reinfeksi maupun reaktivasi, merupakan tanda timbulnya respon humoral. Pada fase selanjutnya, IgM di dalam sirkulasi akan diswicing oleh IgG dan kadarnya bertahan cukup lama. Respon imun yang diperankan oleh IgG memungkinkan terjadinya eliminasi dan destruksi takizoit dari sistem sirkulasi, karena IgG memiliki kemampuan menginduksi reaksi komplemen melalui jalur klasik, opsonisasi dan ADCC (Poudrier *et al*, 1999).

Penggunaan vaksin dari antigen *T.gondii* dimaksudkan untuk menginduksi munculnya respon imun baik humora. Respon imun yang muncul tersebut diharapkan akan mampu memberikan perlindungan atau proteksi yang spesifik terhadap infeksi *T. gondii* (Cesbron-Delauw, 2001). Antigen protein solubel yang terdiri dari semua protein GRA, MIC, ROP serta sebagian SAG belum pernah dilaporkan pada penggunaan intranasal (Alexander *et al*, 1996 dan Yap *et al*, 1998). Penggunaan protein solubel akan sangat menguntungkan karena memiliki potensi untuk menginduksi respon imun yang spesifik terhadap semua jenis antigen *T. gondii* yaitu SAG, GRA, MIC dan ROP. Diharapkan potensi proteksinya juga akan lebih baik dibanding penggunaan antigen secara parsial dari masing masing komponen protein solubel (Cesbron-Delauw, 2001).

Aplikasi intranasal dipandang lebih menguntungkan karena peluang degradasi antigen yang kecil dan memerlukan jumlah antigen yang kecil untuk menginduksi respon imun dibanding aplikasi lainnya (Debard *et al.*, 1999). Pada mukosa ditemukan komponen sistem imun seperti limfosit T, limfosit B dan APC (Hammalers, 1990; Sminia and Kraal, 1999). Adanya APC memungkinkan proses penyajian antigen untuk dikenali oleh limfosit, juga sel dendritik subset kedua (DC₂) sebagai APC yang memiliki kecenderungan untuk menginduksi sel Th₂ (Pulendran *et al.*, 2001).

Proses lainnya APC diperankan oleh limfosit B, dimana limfosit B memiliki antigen MHC II yang diperlukan untuk merangsang limfosit T. Limfosit B dapat mengikat antigen melalui immunoglobulin pada permukaannya dan mempresentasikannya ke limfosit Th dalam hubungannya dengan MHC II. Ekspresi MHC II pada APC dapat ditingkatkan, salah satu substansi yang dilaporkan dapat menginduksi peningkatan molekul MHC II (Fischer *et al.*, 1996).

Ajuvan yang mampu memperbaiki dan meningkatkan respon imun mukosa tersebut salah satunya adalah CT. Cara kerja CT memperlambat pelepasan antigen dan menginduksi migrasi APC (Elson and Dertzbaugh, 1994). Juga dapat bekerja dengan merubah jalur proses antigen pada molekul MHC dan diferensiasi limfosit (Giuliani *et al.*, 1998). Pada penggunaan CT sebagai ajuvan yang diberikan bersama SAG1 maupun ovalbumin secara intranasal diketahui mampu memperbaiki dan meningkatkan respon imun spesifik yang muncul. Berdasarkan bukti tersebut diduga bahwa penggunaan SPTAg sebagai kandidat vaksin toksoplasmosis secara intranasal tanpa ajuvan akan kurang imunogenik. Oleh sebab itu penggunaan CT sebagai ajuvan mukosa bersama dengan SPTAg perlu dilakukan untuk evaluasi perbedaan respon imun yang muncul (Abbas *et al.*, 2000).

Limfosit T helper (Th_1), sel $T/CD8^+$, makrofag maupun sel pembunuh alamiah (sel NK) sebagai perantara timbulnya respon imun seluler pada infeksi *T. gondii* sehingga terjadi aktivasi respon imun seluler. Sel Th_1 berfungsi untuk membantu mengaktivasi sel $T/CD8^+$ agar dapat melakukan fungsi sitolitiknya pada sel target yang telah terinfeksi. Sel Th_2 berfungsi untuk stimulasi limfosit B agar berproliferasi dan berdiferensiasi menjadi sel plasma untuk menghasilkan immunoglobulin. Adapun makrofag dan sel pembunuh alamiah berguna untuk fagositosis dan destruksi takizoit baik ekstra maupun intraseluler (Poudrier *et al.*, 1999).

Perbedaan respon imun adaptif spesifik dapat terjadi karena toksin kolera (CT) lebih dominan menstimulasi sekresi sitokin oleh sel Th₂. Respon imun demikian akan menghasilkan IgG pada mencit. Implikasi yang terjadi adalah munculnya pola respon imun yang seimbang, baik respon imun seluler maupun respon imun humoral (IgG). Pola respon imun yang berbeda tersebut akan memberikan konsekuensi protektifitas yang berbeda pula (Alexander *et al*, 1996 dan Yap *et al*, 1998).

3.2 Hipotesis Penelitian

Berdasarkan penalaran empiris deduktif yang diperoleh dari fakta-fakta yang tercantum di dalam tinjauan pustaka dan dirangkuman dalam landasan teori di atas, maka diajukan hipotesis penelitian sebagai berikut :

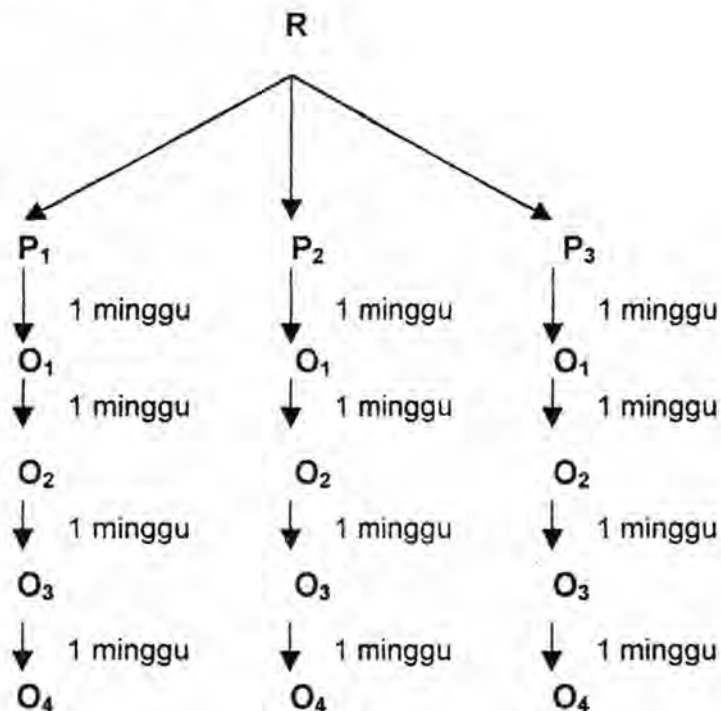
1. Terdapat perbedaan respon imun berupa nilai *optical density* (OD) Ig G hewan coba akibat pemberian SPTAg dengan atau tanpa ajuvan CT secara intranasal?
2. Terdapat pengaruh waktu pengambilan serum terhadap respon imun berupa nilai OD Ig G akibat pemberian SPTAg dengan atau tanpa ajuvan CT secara intranasal?
3. Terdapat interaksi antara waktu pengambilan serum dengan pemberian SPTAg dengan atau tanpa ajuvan CT secara intranasal?

BAB 4

METODA PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Jenis penelitian yang akan dilakukan adalah penelitian eksperimental laboratoris dengan menggunakan rancangan penelitian Faktorial Sama Subyek (3×5). Rancangan ini dipergunakan dengan tujuan penelitian adalah untuk mengetahui efek gabungan atau interaksi antara 2 variabel bebas penelitian yakni variabel waktu dan perlakuan terhadap variabel tergantung penelitian yakni kadar IgG (Zainuddin, 2001).



- Keterangan :
- R : Randomisasi
 - P₁ : Kelompok Perlakuan 1 (SPTAg)
 - P₂ : Kelompok Perlakuan 2 (SPTAg + CT)
 - P₃ : Kelompok Perlakuan 3 (PBS)
 - O₁ : Pengukuran Variabel Penelitian pada P₁
 - O₂ : Pengukuran Variabel Penelitian pada P₂
 - O₃ : Pengukuran Variabel Penelitian pada P₃
 - O_{1,1} : Pengukuran Variabel Penelitian pada P₁ pertama kali
 - O_{1,2} : Pengukuran Variabel Penelitian pada P₁ kedua kali
 - O_{1,3} : Pengukuran Variabel Penelitian pada P₁ ketiga kali

O_{1,4} : Pengukuran Variabel Penelitian pada P₁ keempat kali

4.2 Populasi, Sampel, Besar Sampel, dan Teknik Pengambilan Sampel

Populasi dan subyek penelitian adalah kelompok mencit (*Mus musculus*) strain BALB/c yang diperoleh dari populasi mencit di tempat pembiakan di Laboratorium Pusat Bioteknologi Fakultas Kedokteran Universitas Gajah Mada Yogyakarta. Sampel diambil dari populasi *infinite*, terdiri atas 60 ekor mencit yang dibagi menjadi 3 kelompok yaitu ; kelompok 1 adalah kelompok yang diimunisasi dengan SPTAg *T. gondii* tanpa ajuvan CT secara intranasal, kelompok 2 adalah kelompok yang diimunisasi SPTAg *T. gondii* dengan ajuvan CT secara intranasal, dan kelompok 3 adalah kelompok kontrol yang hanya diberi PBS tanpa SPTAg *T. gondii* secara intranasal yaitu *Phosphat Buffered Saline* (PBS). Masing-masing kelompok terdiri atas 20 ekor yang diambil secara acak (*simple random sampling*) dengan cara mengundi dari populasi mencit yang terlebih dahulu diberi nomor (Zainuddin, 2001).

Besar sampel untuk masing-masing kelompok replikasi adalah 5 ekor, yang ditentukan berdasarkan rumus besar sampel dengan rumus Federer sebagai berikut : (Lamenschow *et al*, 1990)

$$(n - 1) (R - 1) \geq 15$$

Keterangan : n = besar sampel
 R = jumlah perlakuan

Dengan perhitungan

$$\begin{aligned} (p - 1) (u - 1) &\geq 15 \\ (15 - 1) (u - 1) &\geq 15 \\ 14 (u - 1) &\geq 15 \\ 14u - 14 &\geq 15 \\ u &\geq 2,07 \rightarrow u \geq 3, \text{ jadi dilakukan 4 kali pengulangan} \end{aligned}$$

Keterangan : p = perlakuan (3 x 5)
 u = ulangan

4.3 Variabel Penelitian

4.3.1 Variabel Bebas

Variabel bebas pada penelitian ini adalah :

- Pemberian SPTAg *T. gondii* secara intranasal pada hewan coba.
- Waktu pengamatan setiap minggu sebanyak 4 kali

4.3.2 Variabel Tergantung

Variabel tergantung pada penelitian ini adalah IgG pada serum hewan coba.

4.4 Definisi Operasional Variabel

- a. SPTAg *T. gondii* adalah kumpulan antigen yang terdiri atas antigen SAG, ROP, GRA dan MIC yang diisolasi secara bersama-sama dari *T. gondii* (Cesbron-Delauw, 2001).
- b. Ajuvan CT adalah substansi yang dihasilkan *Vibrio cholera* yang membantu memperbaiki atau meningkatkan respon imun individu terhadap suatu antigen yang imunogenitasnya lemah (Elgert, 1996; Sears dan Kaper, 1996).
- c. Respon imun IgG adalah peningkatan kadar IgG akibat pemberian SPTAg. Peningkatan kadar IgG ditentukan dengan melihat *Optical Density* IgG yang ditentukan dengan teknik ELISA tidak langsung (*indirect ELISA*) (Alexander *et al*, 1996).

4.5 Bahan Penelitian

4.5.1 Bahan Isolasi SPTAg

Bahan untuk imunisasi berupa SPTAg hasil isolasi dari takizoit *T. gondii* galur RH yang diperoleh dari Program Studi Bioteknologi, Universitas Gadjah Mada dan ajuvan CT (Sigma Chem., USA). Bahan untuk isolasi SPTAg antara lain:

- Amonium Klorida (NH_4Cl)
- Natrium Klorida (NaCl)
- *Phosphat Buffered Saline* (PBS) pH 7,4
- *Phenylmethylsulfonyl Fluoride* (protease inhibitor PMSF) (Sigma Chem., USA)
- *Tosyl Phenylalanine Cholomethyl Ketone* (TPCK) (Sigma Chem., USA)

4.5.2 Bahan Pemeriksaan

Diagnosis dengan teknik ELISA tidak langsung (*enzyme linked immunosorbent assay indirect*) dilakukan untuk mendeteksi IgG. Bahan-bahan yang diperlukan mendeteksi imunoglobulin dengan ELISA tidak langsung tersebut meliputi semua bahan untuk larutan penyangga (*buffer*) dan reagensia.

Larutan penyangga dan sejenisnya meliputi :

- | | |
|----------------------------------|----------------------------|
| - <i>coating buffer</i> | - <i>incubation buffer</i> |
| - <i>blocking buffer</i> | - <i>substrate buffer</i> |
| - <i>p-nitrophenyl phosphate</i> | - <i>washing buffer</i> |

sebagai substrat

Reagensia yang digunakan antara lain :

- *goat anti mouse IgG alkaline phosphatase conjugated* (Sigma Chem., USA)
- *goat anti mouse IgG monoclonal antibody* (Sigma Chem., USA)
- *mouse IgG* (Sigma Chem., USA)
- H_2SO_4

4.5.3 Hewan coba dan parasit

Hewan coba yang digunakan untuk penelitian adalah mencit (*Mus musculus*) strain BALB/c betina yang dibeli dari Laboratorium Pusat Bioteknologi Fakultas Kedokteran Universitas Gajah Mada Yogyakarta. Umur yang digunakan untuk penelitian berkisar antara 6 sampai 7 minggu dengan berat rata rata 15 –

20 gram. Parasit *T. gondii* yang digunakan adalah galur RH yang diperoleh dari Program Studi Bioteknologi, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.

4.6 Instrumen Penelitian

Alat-alat yang diperlukan antara lain :

- Nunc-Immuno™ *maxisorb 96 well microplate* untuk ELISA (Nunc Int., Denmark)
- *ELISA Reader Titertek® Multiskan® MCC/ 340* (Labsystems, Finland)
- Sentrifus *Hermle Z 2314* (Hermle AG, Germany)
- Inkubator
- Freezer -20 °C

4.7 Prosedur Penelitian

Prosedur pelaksanaan penelitian terdiri atas beberapa tahapan sebagai berikut :

4.7.1 Tahap Isolasi Antigen

Proses isolasi SPTAg dari takizoit *T. gondii* galur RH sampai siap digunakan untuk vaksinasi terdiri atas tiga tahapan. Pertama yaitu perbanyak takizoit dari stabilat beku dalam nitrogen cair atau freezer – 70°C. Tahap kedua adalah isolasi SPTAg dari takizoit. Tahap ketiga adalah pengukuran kadar SPTAg yang telah diperoleh. Adapun rician tahapan tersebut adalah sebagai berikut :

4.7.1.1 Perbanyak Takizoit *Toxoplasma gondii*

Stabilat beku takizoit *T. gondii* galur RH yang disimpan dalam nitrogen cair atau freezer – 70 °C di Laboratorium Bioteknologi, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta. Stabilat disuntikkan intraperitoneal pada mencit galur Swiss untuk perbanyak takizoit, setelah dilakukan *thawing*. Dosis infeksi yang digunakan

untuk pasase pertama dari stabilat adalah 1×10^7 per ekor mencit sebanyak tiga ekor.

Pada pasase pertama takizoit dipanen kemudian disuntikkan lagi ke – 40 ekor mencit atau lebih untuk perbanyak pasase kedua. Sisanya hasil panen pasase pertama dibuat sebagai stabilat. Tujuan perbanyak pasase kedua adalah untuk memperoleh jumlah minimal 1×10^9 takizoit dalam sekali proses isolasi, jika jumlah takizoit total dari panen pasase kedua kurang dari 1×10^9 atau SPTAg yang diisolasi masih belum mencukupi, maka perbanyak takizoit dilanjutkan pada pasase selanjutnya.

4.7.1.2 Panen Takizoit dan Isolasi SPTAg

Pemanenan dilakukan dengan membunuh mencit, caranya dilakukan dislokasi pada leher, yaitu dengan meletakkan mencit pada tempat yang relatif rata, kemudian gunting atau pinset diletakkan dan ditekan pada belakang kepala diikuti dengan penarikan ekor secara kuat dan tiba tiba. Setelah mencit mati, kemudian dibaringkan dengan posisi terlentang dan rongga abdomen dibuka.

NaCl fisiologis disuntikkan secara intraperitoneal ke dalam rongga peritoneum sebanyak 5 – 10 ml, kemudian di maserasi dan homogenisasi. Cairan dari rongga peritoneum dihisap kembali dengan *syringe* dan ditampung dalam tabung konikal. Selanjutnya tabung konikal disentrifus menggunakan Megafuge 1.0 dengan kecepatan 3000 rpm selama 10 menit.

Penambahan amonium klorida dilakukan apabila dalam pelet masih terdapat eritrosit maka dilakukan resuspensi. Resuspensi disentrifus kembali selama 10 menit dengan kecepatan 3000 rpm yang sebelumnya ditambah NaCl. Setelah bersih pelet kembali diresuspensi dalam NaCl dan dilewatkan melalui jarum 27G ke dalam tabung konikal bersih lainnya, kemudian diperiksa dalam hemositometer Neubeuer dan dihitung jumlahnya.

Takzoit yang telah dihitung dilakukan resuspensi dalam NaCl ditambah protease inhibitor PMSF 1 mM dan TPCK 10 µg/ml. Selanjutnya disonikasi pada 180 m amplitudo selama 10 x 1 minute pulse, kemudian disentrifus dengan kecepatan 3000 rpm selama 30 menit pada temperatur 4 °C menggunakan sentrifus Beckman J – 6B. Supernatan yang diperoleh merupakan SPTAg yang terdiri dari semua jenis antigen sekretori dan ekskretori (baik MIC, ROP maupun GRA).

Hasil SPTAg dibagi menjadi tiga kelompok yang masing masing terbagi atas beberapa aliquot. Kelompok pertama untuk vaksinasi, kelompok kedua untuk pelapisan (*coating*) pada mikroplate saat dilakukan ELISA, dan kelompok ketiga untuk konfirmasi protein antigen secara kuantitatif menggunakan *BioRad Protein Assay*.

4.7.1.3 Pengukuran Kadar SPTAg

Hasil SPTAg diukur konsentrasinya menggunakan *BioRad Protein Assay*. Kurva baku standar terlebih dahulu dibuat sebelum dilakukan pengukuran kadar SPTAg dari *Toxoplasma gondii* dengan menggunakan BSA (*bovine serum albumine*). Stok larutan BSA (1 mg BSA/ml H₂O) masing masing diambil 5 µl (a), 10 µl (b), 15 µl (c) dan 20 µl (d). Selanjutnya setiap mikrovolume stok BSA dicampur dengan 795 µl (a), 790 µl (b), 785 µl (c) dan 780 µl (d) ddH₂O (*double destilated H₂O*) dalam setiap tabung eppendorf.

Semua tabung eppendorf (a–d) ditambahkan *BioRad Protein Assay* dengan volume masing masing 200 µl. Larutan BSA – Biorad – ddH₂O dibaca dengan spektrofotometer Beckman DU[®] 65 (Smithkline Beckman, USA) pada panjang gelombang 595 setelah dihomogenisasi. Penetapan kadar SPTAg dari *Toxoplasma gondii* galur RH dengan spektrofotometer kemudian dibuat kurva baku standar.

Pemeriksaan kadar SPTAg terlebih dahulu disiapkan 2 tabung eppendorf yang diisi dengan ddH₂O masing masing 798 µl dan 796 µl, kemudian diisi lagi dengan 200 µl Biorad. SPTAg yang diperoleh diambil masing masing dengan volume 2 µl dan 4 µl kemudian dihomogenisasi. Setelah homogen masing masing eppendorf dibaca dengan spektrofotometer Beckman DU[®] 65 pada panjang gelombang 595 nm, nilai OD diperoleh dari kedua sampel tersebut.

4.7.2 Cara Imunisasi

Imunisasi dilakukan secara intranasal terhadap semua sampel dengan meneteskan SPTAg (dalam PBS) dan CT dalam nostril mencit BALB/c. Imunogen yang digunakan adalah SPTAg. Dosis yang digunakan pada SPTAg adalah 1,25 µg/µl (10 µg per ekor) (Debard *et al*, 1996), sedangkan dosis ajuvan CT adalah 1 µg per ekor (Douce *et al*, 1997). Total volume imunogen adalah 8 ml per ekor (untuk 2 nostril). Imunisasi dilakukan 1 kali pada awal penelitian dengan meneteskan imunogen pada kedua nostril mencit.

4.7.3 Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Langkah-langkah pemeriksaan ELISA adalah sebagai berikut :

a. Pengambilan serum

Pungsi dari pleksus retroorbitalis dilakukan untuk pengambilan sampel darah dengan menggunakan mikrokapiler hematokrit yang mengandung antikoagulan heparin, kemudian darah ditampung dalam eppendorf 1,5 ml dan diinkubasi dalam 4 °C selama satu jam dan selanjutnya disentrifus menggunakan sentrifus Hermle Z 2314 untuk memisahkan serum. Sampel serum kemudian dipindahkan ke tabung eppendorf yang lain serta dibagi dalam beberapa aliquot dan disimpan pada -20 °C sampai saat evaluasi dengan ELISA tidak langsung.

Tabel 4.1 Langkah Perlakuan dan Pengambilan Serum pada Penelitian

Hari Ke-	Kegiatan
1	Imunisasi
7	Pengambilan serum ke-1
14	Pengambilan serum ke-2
21	Pengambilan serum ke-3
28	Pengambilan serum ke-4

b. Cara pemeriksaan dengan teknik ELISA tidak langsung

Secara prinsip pengukuran OD imunoglobulin dilakukan dengan teknik ELISA tidak langsung (*indirect ELISA*). Antigen dilapiskan (*coating*) pada *microplate* dengan konsentrasi maksimal 10 mg/ml dan diinkubasi pada suhu 4°C selama 24 jam, kemudian dilakukan pencucian dengan PBS-Triton X-100. Selanjutnya pada masing-masing sumuran *microplate* ditambahkan serum dan diinkubasi pada 37°C selama satu jam, kemudian dicuci dengan PBS-Triton X100, ditambahkan konjugat *goat anti mouse IgG alkaline phosphatase* yang diencerkan 1 : 3000 dan diinkubasi selama 1 jam pada 37°C. *Microplate* dicuci 3 kali dengan PBS-Triton X100, kemudian ditambahkan nitrofenilfosfat pada setiap sumuran dan diinkubasi pada 37°C selama 10-20 menit. Reaksi yang terjadi dihentikan dengan menambahkan H₂SO₄. Hasil pengukuran yang dinyatakan dalam nilai kerapatan optik (*Optical Density, OD*) dibaca dengan *ELISA reader* pada 405 nm.

4.7 Lokasi dan Waktu Penelitian

Lokasi penelitian ini di Laboratorium Pusat Bioteknologi Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada Yogyakarta dari bulan Juni 2004 sampai Agustus 2004.

4.8 Tahapan Analisis Data

Data hasil penelitian ini ditabulasi dan dianalisis dengan program SPSS 10,0 *for windows* (SPSS Inc. 1999) dengan taraf kepercayaan 95% ($\alpha = 0,05$), melalui beberapa tahap, yaitu :

1. Uji Deskriptif
2. Penentuan nilai ambang OD, sebagai penentu nilai OD positif dan negatif dari titer IgG dengan ketentuan sebagai berikut : (Paul, 1999; Aubert *et al.*, 2000) :

$$\text{Nilai ambang OD} = \text{mean OD kontrol negatif (PBS)} + (2 \times \text{SD OD kontrol negatif (PBS)})$$

Nilai OD dinyatakan positif apabila lebih besar dari nilai ambang OD dan negatif bila kurang dari nilai ambang OD.

3. Uji Normalitas
4. Uji Anova Satu Arah
5. Uji LSD

BAB 5

ANALISIS HASIL PENELITIAN

5.1 Hasil Penelitian

Data yang didapat dari penelitian ini adalah hasil pengukuran variabel *Optical Density* IgG dari serum mencit setiap minggu (minggu I – IV), hasil data tersebut adalah sebagai berikut :

Tabel 5.1 Hasil Pengukuran Nilai *Optical Density* IgG dari Serum Mencit

Waktu (minggu)	Perlakuan	Replikasi				
		1	2	3	4	5
I	PBS	0,348	0,373	0,325	0,328	0,393
	SPTAg	0,711	0,546	0,476	0,553	0,426
	SPTAg + CT	0,363	0,309	0,613	0,625	0,314
II	PBS	0,348	0,373	0,325	0,328	0,393
	SPTAg	0,640	0,517	0,546	0,487	0,425
	SPTAg + CT	0,384	0,420	0,514	0,470	0,331
III	PBS	0,348	0,373	0,325	0,328	0,393
	SPTAg	0,650	0,676	0,616	0,520	0,432
	SPTAg + CT	0,836	0,397	0,359	0,391	0,502
IV	PBS	0,348	0,373	0,325	0,328	0,393
	SPTAg	0,405	0,376	1,672	0,428	0,349
	SPTAg + CT	0,371	0,417	0,334	0,378	0,321

5.2 Hasil Uji Deskriptif

Hasil uji deskriptif diketahui bahwa data kelompok perlakuan untuk variabel *Optical Density* IgG dari serum mencit setiap minggu (minggu I – IV) dapat dilihat pada tabel berikut :

Tabel 5.2 Data rata-rata dan simpangan baku OD IgG mingguan

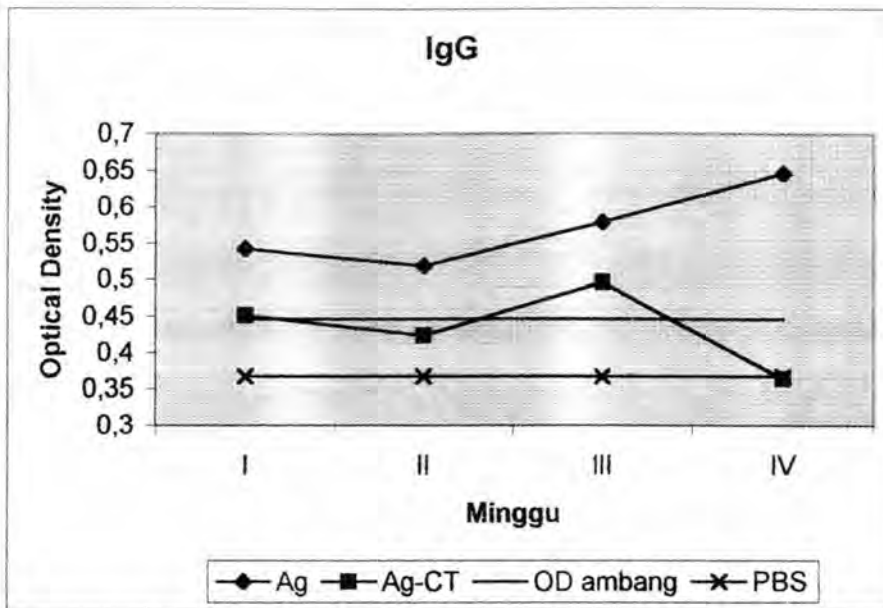
Waktu (minggu)	Perlakuan (Kelompok)	Mean \pm SD
I	PBS	0,309 \pm 0,064
	SPTAg	0,542 \pm 0,060
	SPTAg + CT	0,408 \pm 0,137
II	PBS	0,309 \pm 0,064
	SPTAg	0,519 \pm 0,051
	SPTAg + CT	0,412 \pm 0,077
III	PBS	0,309 \pm 0,064
	SPTAg	0,554 \pm 0,098
	SPTAg + CT	0,412 \pm 0,062
IV	PBS	0,309 \pm 0,064
	SPTAg	0,646 \pm 0,034
	SPTAg + CT	0,351 \pm 0,027

Sedangkan penentuan nilai ambang OD IgG serum mencit pada penelitian ini didapat sebagai berikut :

X : mean OD IgG kontrol negatif (PBS) = 0,309

Y : SD OD IgG kontrol negatif (PBS) = 0,064

Jadi, nilai ambang OD IgG = $X + (2 \times SD)$
 $= 0,309 + (2 \times 0,064)$
 $= 0,437$



Gambar 5.1 Grafik rata-rata OD IgG mingguan berdasarkan Tabel 5.2

Berdasarkan nilai ambang OD IgG (gambar 5.1) terdapat perbedaan pada perlakuan imunisasi SPTAg dengan imunisasi SPTAg ditambah CT, dimana rata-rata OD IgG pada imunisasi SPTAg (0,565) memiliki nilai positif (lebih besar dari nilai ambang OD IgG), sedangkan rata-rata OD IgG pada imunisasi SPTAg dengan CT (0,395) memiliki nilai negatif (kurang dari nilai ambang OD IgG).

Data yang didapat dari penelitian ini adalah hasil pengukuran variabel pengukuran OD IgG minggu I, II, III, dan IV. Data tersebut terlebih dahulu diuji normalitas dengan uji Kolmogorov-Smirnov, selanjutnya variabel OD dianalisis dengan uji Faktorial Sama Subyek, uji Anova Satu Arah dan LSD.

5.3 Hasil Uji Normalitas Distribusi Data

Uji Kolmogorof-Smirnov menunjukkan bahwa variabel OD IgG berdistribusi normal, seperti terlihat pada tabel berikut :

Tabel 5.3 Hasil Uji Kolmogorof-Smirnov Data Variabel OD IgG berdasarkan kelompok perlakuan

No	Kelompok (perlakuan)	Nilai p Variabel OD IgG			
		Minggu I	Minggu II	Minggu III	Minggu IV
1.	PBS	0,983*	0,966*	1,000*	0,958*
2.	SPTAg	0,886*	1,000*	0,928*	0,268*
3.	SPTAg + CT	0,694*	1,000*	0,780*	0,995*

Ket : * : data berdistribusi normal ($p > 0,05$) (lihat lampiran 3)

Uji normalitas ini dilakukan terhadap variabel tergantung (OD), bertujuan untuk mengetahui apakah data yang diperoleh dari sampel berdistribusi normal atau tidak (Zainuddin, 2001). Melalui uji Kolmogorov-Smirnov terhadap variabel tergantung, didapatkan bahwa semua variabel tersebut berdistribusi normal ($p > 0,05$), sehingga dapat dilakukan analisis lanjut dengan uji anova (lihat lampiran 3).

5.4 Hasil Uji Anova Faktorial Sama Subyek

5.4.1 Variabel waktu

Analisis multivariat waktu bertujuan untuk menunjukkan bahwa terdapat atau tidak perbedaan signifikan pada variabel waktu pengambilan serum dari semua variabel perlakuan yang menyebabkan perubahan nilai OD IgG.

Tabel 5.4 Hasil Nilai Koefisien *Hotelling's Trace* untuk variabel waktu pengambilan serum

Variabel	df	Nilai F	Nilai p	Interpretasi
Waktu	2	0,902	0,474*	Tidak signifikan

Ket : * : menunjukkan perbedaan yang tidak signifikan antar waktu kelompok perlakuan ($p > 0,05$) (lihat lampiran 7)

Pada tabel 5.4 diperoleh hasil uji anova $df = 3$, nilai $F = 0,902$, dan $p = 0,474$ dengan Interpretasi tidak terdapat perbedaan signifikan pada semua variabel waktu pengambilan serum dari semua variabel perlakuan yang menyebabkan perubahan nilai OD IgG, dimana ($p > 0,05$) (lihat lampiran 7).

5.4.2 Variabel perlakuan

Analisis univariat dan *test of between-subjects effects* bertujuan untuk menunjukkan bahwa terdapat atau tidak perbedaan signifikan pada semua variabel kelompok perlakuan yang menyebabkan perubahan nilai OD IgG.

Tabel 5.5 Hasil analisis univariat dan *test of between-subjects effects* untuk kelompok perlakuan

Variabel	df	Nilai F	Nilai p	Interpretasi
Perlakuan	2	5,870	0,017*	signifikan

Ket : * : menunjukkan perbedaan yang signifikan antar kelompok perlakuan ($p < 0,05$) (lihat lampiran 7 dan 8)

Pada tabel 5.5 diperoleh hasil uji anova $df = 2$, nilai $F = 5,870$, dan $p = 0,017$ dengan Interpretasi terdapat perbedaan signifikan pada semua variabel kelompok perlakuan yang menyebabkan perubahan nilai OD IgG, dimana ($p < 0,05$) (lihat lampiran 7 dan 8).

Uji lanjutan dengan LSD (*pairwise comparisons*) bertujuan untuk menunjukkan bahwa terdapat atau tidak berbeda signifikan antar variabel kelompok perlakuan yang menyebabkan perubahan nilai OD IgG.

Tabel 5.6 Hasil analisis LSD variabel antar kelompok perlakuan (*pairwise comparisons*)

Perlakuan	Nilai p	Interpretasi
PBS dengan SPTAg	0,006 [#]	sangat signifikan
PBS dengan SPTAg	0,286	tidak signifikan
SPTAg dengan SPTAg + CT	0,044*	signifikan

Ket : * : menunjukkan perbedaan yang signifikan antar kelompok perlakuan ($p < 0,05$) (lihat lampiran 8)

[#] : menunjukkan perbedaan yang sangat signifikan antar kelompok perlakuan ($p < 0,01$) (lihat lampiran 8)

Pada tabel 5.6 diperoleh analisis hasil LSD (*pairwise comparisons*) antar variabel kelompok perlakuan, PBS dengan SPTAg nilai $p = 0,006$ dengan Interpretasi terdapat perbedaan sangat signifikan antar variabel kelompok

perlakuan PBS dengan SPTAg yang menyebabkan perubahan nilai OD IgG, dimana ($p < 0,01$). Perlakuan PBS dengan SPTAg + CT nilai $p = 0,286$ dengan Interpretasi tidak terdapat perbedaan signifikan antar variabel kelompok perlakuan PBS dengan SPTAg + CT yang menyebabkan perubahan nilai OD IgG, dimana ($p > 0,05$). Perlakuan SPTAg dengan SPTAg + CT nilai $p = 0,044$ dengan Interpretasi terdapat perbedaan signifikan pada antar variabel kelompok perlakuan SPTAg dengan SPTAg + CT yang menyebabkan perubahan nilai OD IgG, dimana ($p < 0,05$) (lihat lampiran 8).

5.4.3 Variabel waktu dengan variabel perlakuan

Analisis multivariat antara variabel waktu dengan variabel kelompok perlakuan bertujuan untuk menunjukkan terdapat atau tidak interaksi signifikan antar kedua variabel waktu dengan variabel kelompok perlakuan yang menyebabkan perubahan nilai OD IgG.

Tabel 5.7 Hasil Nilai Koefisien *Hotelling's trace* antar variabel waktu dengan variabel perlakuan

Variabel	df	Nilai F	Nilai p	Interpretasi
Waktu dan Perlakuan	18	0,381	0,882*	Tidak terdapat interaksi signifikan

Ket : * : menunjukkan perbedaan yang tidak signifikan antar waktu dan kelompok perlakuan ($p > 0,05$) (lihat lampiran 7)

Pada tabel 5.7 diperoleh hasil uji anova $df = 18$, nilai $F = 0,381$, dan $p = 0,882$ dengan Interpretasi tidak terdapat interaksi signifikan antar variabel waktu dengan variabel perlakuan yang menyebabkan perubahan nilai OD IgG, dimana ($p > 0,05$) (lihat lampiran 7).

5.5 Hasil Deskripsi Uji Anova Satu Arah Sama Subyek

Deskripsi Analisis Anova Satu Arah Sama Subyek bertujuan untuk menunjukkan terdapat atau tidak perbedaan signifikan pada variabel waktu

dengan antar ketiga variabel kelompok perlakuan yang menyebabkan perubahan nilai OD IgG.

Tabel 5.8 Hasil analisis pada variabel waktu dengan antar ketiga variabel kelompok perlakuan

Waktu	df	Nilai F	Nilai p	Interpretasi
Minggu I	2	3,706	0,056	tidak signifikan
Minggu II	2	7,565	0,007*	sangat signifikan
Minggu III	2	3,086	0,083	tidak signifikan
Minggu IV	2	7,565	0,347	tidak signifikan

Ket : * : menunjukkan perbedaan yang sangat signifikan antara waktu dan kelompok perlakuan ($p < 0,01$) (lihat lampiran 9)

Pada tabel 5.8 diperoleh hasil uji anova minggu II $df = 2$, nilai $F = 7,565$, dan $p = 0,007$ dengan Interpretasi terdapat perbedaan sangat signifikan pada minggu II dengan antar ketiga variabel perlakuan yang menyebabkan perubahan nilai OD IgG, dimana ($p < 0,01$). Sedangkan pada minggu I, III, dan IV dengan antar ketiga variabel perlakuan, tidak terdapat perbedaan signifikan yang menyebabkan perubahan nilai OD IgG, dimana ($p > 0,05$) (lihat lampiran 9).

5.6 Hasil LSD (*Post Hoc Tests*)

Analisis LSD ini bertujuan untuk menunjukkan terdapat atau tidak perbedaan signifikan variabel waktu tertentu dengan antara dua variabel kelompok perlakuan, yang menyebabkan perubahan nilai OD IgG.

Tabel 5.9 Hasil *Least Significant Difference (Post Hoc Tests)*

Variabel Waktu	Perlakuan	Nilai p	Interpretasi
Minggu I	PBS dengan SPTAg	0,019*	signifikan
Minggu II	PBS dengan SPTAg	0,002#	sangat signifikan
Minggu II	SPTAg dengan SPTAg +CT	0,037*	signifikan
Minggu III	PBS dengan SPTAg	0,030*	signifikan

Ket : * : menunjukkan perbedaan yang signifikan antar waktu dan kelompok perlakuan ($p < 0,05$) (lihat lampiran 10)

: menunjukkan perbedaan yang sangat signifikan antar waktu dan kelompok perlakuan ($p < 0,01$) (lihat lampiran 10)

Pada tabel 5.9 diperoleh hasil uji LSD minggu I dengan antar perlakuan PBS dan SPTAg, nilai $p = 0,019$ dengan Interpretasi terdapat perbedaan signifikan yang menyebabkan perubahan nilai OD IgG, dimana ($p < 0,05$). Minggu II dengan antar perlakuan PBS dan SPTAg, nilai $p = 0,002$ dengan Interpretasi terdapat perbedaan sangat signifikan yang menyebabkan perubahan nilai OD IgG, dimana ($p < 0,01$). Minggu II dengan antar perlakuan SPTAg dan SPTAg + CT, nilai $p = 0,037$ dengan Interpretasi terdapat perbedaan signifikan yang menyebabkan perubahan nilai OD IgG, dimana ($p < 0,05$). Minggu III dengan antar perlakuan PBS dan SPTAg, nilai $p = 0,030$ dengan Interpretasi terdapat perbedaan signifikan yang menyebabkan perubahan nilai OD IgG, dimana ($p < 0,05$) (lihat lampiran 10).

BAB 6

PEMBAHASAN

Kemampuan proteksi atau perlindungan pada hospes atau manusia terhadap toksoplasmosis sangat tergantung dari respon imun baik seluler maupun humoral. Respon imun humoral berkaitan dengan bentuk takizoit ekstraseluler yang aktif dan invasif dalam sistim sirkulasi (Darcy and Santoro, 1994). Pada sistem sirkulasi imunoglobulin yang berperan utama adalah IgM dan IgG, tetapi IgG bertahan lebih lama dibandingkan dengan IgM.

Respon imun IgG mengalami peningkatan setelah terjadi infeksi atau imunisasi. Peningkatan IgG ternyata mampu meningkatkan resistensi mencit terhadap infeksi *T. gondii* secara *in vivo* (Debard *et al.*, 1996). Imunisasi intranasal dengan SAG (bagian dari SPTAg) pada mencit dapat meningkatkan titer IgG. Protein solubel SPTAg dari takizoit galur RH dengan ajuvan IL 12 telah dipakai untuk imunisasi melalui rute subkutan dan dapat menginduksi respon imun spesifik pada mencit BALB/c (Yap *et al.*, 1998).

Penelitian ini dilakukan pertama untuk mengetahui adanya perbedaan gambaran respon imun IgG mencit setelah imunisasi SPTAg *T. gondii* yang diaplikasikan secara intranasal dengan atau tanpa menggunakan ajuvan CT. Pada uji anova faktorial sama subyek dengan analisis univariat dilakukan untuk membuktikan ada perbedaan respon imun IgG pada variabel perlakuan. Pada penelitian ini terdapat perbedaan bermakna pada respon imun IgG ($p < 0,05$) pada variabel perlakuan (Tabel 5.5). Hal ini menunjukkan bahwa perlakuan dengan imunisasi SPTAg menyebabkan respon imun IgG yang berbeda dibanding dengan imunisasi SPTAg + CT.

Kelompok perlakuan yang diimunisasi SPTAg tanpa ajuvan ternyata dapat menginduksi respon imun IgG sejak minggu pertama dan masih terus meningkat sampai akhir pengamatan yaitu minggu keempat. Nilai OD IgG yang didapatkan pada minggu pertama adalah 0,542, minggu kedua adalah 0,519, dan terus meningkat sampai minggu keempat yaitu 0,646 (Tabel 5.5; Gambar 5.1). Sedangkan kelompok perlakuan yang menggunakan ajuvan CT, menimbulkan respon imun IgG yang rendah pada minggu pertama (0,408), kedua (0,493) dan ketiga (0,412), sampai minggu keempat (0,351) respon imun IgG terus menurun tajam dibanding dengan kelompok tanpa CT yang terus meningkat (Gambar 5.1). Analisis statistik menunjukkan bahwa imunisasi SPTAg dengan imunisasi SPTAg + CT tidak terdapat perbedaan bermakna ($p > 0,05$) pada variabel perlakuan (Tabel 5.8).

Karena adanya perbedaan respon imun pada variabel perlakuan maka diperlukan uji lanjut dengan *pairwise comparisons*. Pada uji ini terdapat perbedaan sangat bermakna pada respon imun IgG pada kelompok perlakuan PBS dengan SPTAg ($p < 0,01$), dan terdapat perbedaan bermakna pada kelompok perlakuan SPTAg dengan SPTAg + CT ($p < 0,05$) (Tabel 5.6). Analisis statistik ini menunjukkan bahwa terdapat perbedaan gambaran respon imun IgG akibat variabel perlakuan SPTAg dengan SPTAg + CT.

Tujuan penelitian yang kedua adalah untuk mengetahui pengaruh waktu terhadap gambaran respon imun IgG mencit setelah imunisasi SPTAg *T. gondii* yang diaplikasikan secara intranasal dengan atau tanpa menggunakan ajuvan CT. Pada analisis multivariat waktu menunjukkan bahwa tidak terdapat perbedaan bermakna pada respon imun IgG antara variabel waktu ($p > 0,05$) (Tabel 5.4), hal ini kemungkinan disebabkan adanya selisih nilai rata-rata mingguan antara kelompok perlakuan yang tidak banyak (Tabel 5.2).

Tujuan penelitian ketiga adalah untuk mengetahui interaksi antara waktu imunisasi terhadap perbedaan respon imun IgG mencit setelah imunisasi SPTAg *T. gondii* yang diaplikasikan secara intranasal dengan atau tanpa menggunakan ajuvan CT. Pada analisis multivariat menunjukkan bahwa tidak terdapat interaksi bermakna pada respon imun IgG antar variabel waktu dan variabel perlakuan ($p > 0,05$) (Tabel 5.7). Hal ini juga dapat dilihat dari nilai rata-rata antara variabel perlakuan yang tidak berbeda jauh pada antar variabel waktu (mingguan), baik setelah imunisasi SPTAg *T. gondii* yang diaplikasikan secara intranasal maupun yang dengan menggunakan ajuvan CT (Tabel 5.2).

Analisis uji anova satu arah sama subyek merupakan uji lanjut dari interaksi respon imun IgG antara variabel waktu dengan variabel perlakuan. Hasil analisis uji ini adalah terdapat perbedaan sangat bermakna pada variabel perlakuan dengan variabel waktu minggu kedua ($p < 0,01$) (Tabel 5.8). Apabila dilihat dari simpangan baku antar variabel perlakuan di minggu kedua terdapat simpangan baku yang besar dibandingkan dengan antar variabel perlakuan dengan variabel waktu lainnya (Tabel 5.2).

Untuk mengetahui perbedaan respon imun IgG pada variabel waktu tertentu antara dua variabel perlakuan dilakukan uji lanjutan dengan LSD. Hasil analisis uji ini adalah terdapat perbedaan bermakna pada respon imun IgG pada minggu pertama hanya antara PBS dan SPTAg ($p < 0,05$), terdapat perbedaan sangat bermakna pada minggu kedua antara PBS dan SPTAg ($p < 0,01$) juga antara SPTAg dan SPTAg + CT terdapat perbedaan bermakna ($p < 0,05$), terdapat perbedaan bermakna pada minggu ketiga hanya antara PBS dan SPTAg ($p < 0,05$) (Tabel 5.9). Dilihat dari rata-rata variabel perlakuan setiap minggu, pada minggu pertama terdapat perbedaan rata-rata yang jauh antara PBS dengan SPTAg, minggu kedua antara PBS dengan SPTAg juga antara

SPTAg dengan SPTAg + CT, minggu ketiga hanya antara PBS dengan SPTAg (Tabel 5.2).

Pengaruh tunggal dari masing-masing perlakuan terhadap perbedaan nilai IgG hanya dapat dibandingkan apabila nilai ambang OD IgG telah ditetapkan (Paul, 1999; Aubert *et al.*, 2000). Berdasarkan nilai ambang OD IgG terdapat perbedaan bahwa nilai rata-rata OD IgG dengan imunisasi SPTAg memiliki nilai positif bila lebih besar dari nilai ambang OD IgG, sedangkan nilai rata-rata OD IgG dengan imunisasi SPTAg + CT memiliki nilai negatif karena kurang dari nilai ambang OD IgG (gambar 5.1). Analisis dari nilai ambang OD IgG pada penelitian ini terdapat perbedaan titer IgG pada imunisasi SPTAg dengan atau tanpa penggunaan ajuvan CT. Pada penelitian ini penambahan ajuvan CT tidak meningkatkan nilai OD IgG dibanding tanpa CT.

Pada imunisasi intranasal dengan menggunakan SPTAg tanpa ajuvan CT ternyata mampu memicu terbentuknya IgG dalam serum. Hasil penelitian tersebut secara umum membuktikan bahwa aplikasi imunisasi intranasal mampu menginduksi respon imun adaptif dalam sirkulasi darah (sistemik). Pada mukosa rongga hidung muncit telah dilaporkan ditemukan komponen sistem imun seperti limfosit T, limfosit B, dan APC (makrofag dan sel dendritik) (Hameleers, 1990; Sminia and Kraal, 2001). Adanya APC memungkinkan pemrosesan dan penyajian antigen untuk dikenali limfosit. Adanya sel asesoris juga memfasilitasi masuknya antigen ataupun ajuvan dan berinteraksi secara langsung dengan APC maupun limfosit. Kondisi tersebut memungkinkan timbulnya respon imun secara lokal pada mukosa hidung dan saluran respirasi atas maupun dalam sirkulasi darah. Sel dendritik dalam mukosa hidung merupakan sel DC_{2i} dan memiliki kecenderungan untuk menginduksi polarisasi ke arah sel Th₂.

Munculnya respon imun secara sistemik disebabkan oleh sel dendritik dan limfosit yang telah teraktivasi dilokasi induksi (*inductive site*) dapat bermigrasi ke berbagai lokasi yang dikenal dengan lokasi target (*effector site*). Pada penelitian ini lokasi induksi adalah di mukosa rongga hidung, sedangkan lokasi target yang dievaluasi adalah dalam sirkulasi darah. Respon imun terhadap SPTAg dari *T. gondii* pada serum darah mencit membuktikan bahwa rute intranasal dapat digunakan untuk menginduksi respon IgG terhadap SPTAg dalam peredaran darah. Beberapa penelitian menyatakan bahwa imunisasi secara intranasal dapat membangkitkan respon imun adaptif sistemik. Induksi respon imun spesifik dalam sistem sirkulasi diawali dengan terjadinya migrasi sel dendritik dan limfosit teraktivasi dari mukosa hidung ke dalam peredaran darah melalui organ limfoid sekunder (Hameleers, 1990; Brandtzaeg *et al*, 2001; Sminia and Kraal, 2001). Limfosit T maupun B yang teraktivasi dari mukosa hidung akan bermigrasi ke dalam sistem sirkulasi melalui kelenjar limfe servikalis posterior dan limpa (Brandtzaeg *et al*, 2001; Sminia and Kraal, 2001).

Protein solubel SPTAg dari *T. gondii* dapat menginduksi respon imun spesifik, yaitu IgG. Kemampuan SPTAg sebagai imunogen tidak terlepas dari komponen protein yang terkandung didalamnya, SPTAg terdiri atas protein dari GRA, MIC dan ROP, juga SAG (Bourguin *et al*, 1998; Cesbron-Delauw, 2001). Keempat protein tersebut (GRA, MIC, ROP dan SAG) telah diketahui memiliki kemampuan sebagai imunogen baik secara tunggal maupun kombinasi (Alexander *et al*, 1996; Cesbron-Delauw *et al*, 1996; Fischer *et al*, 1996; Debard *et al*, 1996; Bourguin *et al*, 1998; Yap *et al*, 1998; Haumont *et al*, 2000; Prigione *et al*, 2000; Velge-Roussel *et al*, 2000; Vercammen *et al*, 2000 dan Bonefant *et al*, 2001).

Mekanisme induksi IgG pada imunisasi intranasal terjadi karena SPTAg akan berinteraksi dan diproses oleh makrofag maupun sel DC₂. Cara pemrosesan antigen dalam DC₂ diduga sangat tergantung pada reseptor FcR yang digunakan oleh SPTAg. Sel DC₂ memiliki kemampuan menginduksi aktivasi limfosit T pembantu (CD4⁺/Th₀) maupun limfosit T sitotoksik (CD8⁺), SPTAg yang merupakan kumpulan dari beberapa jenis protein kemungkinan akan menginduksi aktivasi sel dendritik (DC₂) melalui reseptor yang berbeda satu dengan lainnya (Pulendran *et al*, 2001^a). Induksi reseptor yang berbeda pada DC₂ juga dapat menyebabkan sel dendritik tersebut menginduksi polarisasi sel Th₀ menjadi sel Th₁ dan sel Th₂ pada saat yang sama (Pulendran *et al*, 2001^b). Polarisasi ke arah sel Th₁ dengan menghasilkan sitokin IFN γ dan sel Th₂ yang menghasilkan sitokin IL 13, kedua sitokin tersebut akan menstimulasi *switching* IgM menjadi IgG (Poudrier *et al.*, 1999; Elgert, 1996).

Penggunaan ajuvan CT dengan imunogen SPTAg juga dapat menginduksi terbentuknya IgG dengan aktivasi limfosit B oleh sitokin IL 4, IL 6, dan IL 13 yang dihasilkan oleh sel Th₂. Penggunaan ajuvan toksin kolera (CT) dimaksudkan untuk meningkatkan respon imun terhadap antigen yang rendah imunogenitasnya. Dilaporkan pemberian SAG bersama CT dengan aplikasi intranasal pada mencit menimbulkan respon imun IgG yang lebih tinggi dibanding tanpa ajuvan, puncak IgG dengan pemberian SAG dengan atau tanpa CT adalah pada hari ke-47 setelah imunisasi (Debard *et al.*, 1996).

Pada penelitian ini, imunogenitas SPTAg cukup baik karena direspon oleh sistem imun mukosa pada aplikasi intranasal tanpa ajuvan CT. Sedangkan SPTAg + CT ternyata merubah profil dan kecenderungan respon imun yang muncul seperti terlihat pada grafik rata-rata nilai OD (Gambar 5.1). Kondisi demikian berimplikasi adanya perbedaan yang signifikan antara variabel

perlakuan, variabel waktu dan variabel tergantung (IgG) dengan profil imun yang muncul.

Pada imunisasi SPTAg dengan menggunakan ajuvan CT, diduga sebagian toksin akan berikatan dengan sel epitel mukosa hidung dan sebagian kecil lainnya akan berikatan dengan sel penyaji antigen maupun limfosit T. Interaksi CT, yaitu sub unit A₁ dari Ct (CtA_a) dengan sel epitel akan menginduksi cAMP yang tinggi. Hal ini menyebabkan hambatan proliferasi limfosit T secara keseluruhan, sehingga terjadi supresi respon imun IgG pada fase awal (Ryan *et al.*, 2001; Lopez *et al.*, 2000). Sel Th₂ akan mengaktivasi limfosit B, IL 4 akan menginduksi limfosit B untuk membentuk IgG, sedangkan IL 13 dan IL 13R yang banyak ditemukan pada makrofag yang akan menstimulasi pembentukan IgG (Elgert, 1996). Pada penelitian ini penurunan respon imun IgG dengan imunisasi SPTAg + CT kemungkinan karena terjadi supresi respon imun IgG oleh CT pada fase awal, dan dimungkinkan waktu pengamatan selama empat minggu masih termasuk dalam fase awal respon imun. Oleh karena itu, besar kemungkinan apabila waktu pengamatan diperpanjang sampai minggu ke-6 titer IgG akan meningkat.

Variabel-variabel yang berinteraksi antara imunogen, ajuvan dan waktu pengamatan terhadap peningkatan IgG merupakan representasi profil respon imun yang muncul. Perbandingan berdasarkan perbedaan antar variabel tidak mencerminkan kegunaan nyata dari perbedaan respon imun IgG meskipun secara statistik dinyatakan berbeda nyata atau tidak.

Perbedaan dari variabel-variabel hanya dapat dibandingkan apabila nilai ambang OD yang menunjukkan protektifitas terhadap tantangan yang telah diketahui dan ditetapkan. Berdasar nilai ambang OD antibodi protektif tersebut perbandingan menjadi lebih nyata untuk dilakukan. Perbedaan rata-rata titer IgG

meskipun sangat kecil dan mungkin tidak bermakna secara statistik tetapi jika rata-rata titer IgG satu kelompok di atas nilai ambang protektif sementara yang lain di bawah nilai ambang protektif akan memiliki arti yang sangat mendasar dalam menentukan perbedaan interaksi variabel perlakuan dan variabel waktu.

Berdasarkan nilai ambang OD IgG, kelompok perlakuan SPTAg terdapat perbedaan dengan kelompok perlakuan SPTAg + CT, sebab kelompok perlakuan SPTAg memiliki nilai ambang OD IgG yang tinggi (lebih besar dari nilai ambang OD IgG) daripada kelompok perlakuan SPTAg + CT.

BAB 7**PENUTUP****7.1 Kesimpulan**

Dari hasil penelitian didapatkan kesimpulan sebagai berikut :

1. Terdapat perbedaan bermakna pada gambaran respon imun IgG mencit setelah imunisasi SPTAg *T. gondii* yang diaplikasikan secara intranasal dengan atau tanpa menggunakan ajuvan CT, pada kelompok perlakuan PBS dengan SPTAg, dan SPTAg dengan SPTAg ditambah ajuvan CT.
2. Tidak terdapat perbedaan bermakna pada pengaruh waktu terhadap gambaran respon imun IgG mencit setelah imunisasi SPTAg *T. gondii* yang diaplikasikan secara intranasal dengan atau tanpa menggunakan ajuvan CT.
3. Tidak terdapat interaksi yang bermakna antara waktu imunisasi terhadap perbedaan respon imun IgG mencit setelah imunisasi SPTAg *T. gondii* yang diaplikasikan secara intranasal dengan atau tanpa menggunakan ajuvan CT.
4. Rendahnya respon imun IgG pada imunisasi SPTAg + CT kemungkinan karena respon yang timbul masih merupakan fase awal dalam merespon imunogen yang masuk.

7.2 Saran

1. Waktu pengamatan perlu diperpanjang untuk mengetahui adanya respon imun yang timbul karena imunisasi dengan SPTAg + CT.
2. Perlu dilakukan penambahan besar sampel untuk mengetahui gambaran respon imun Ig G.
3. Perlu dilakukan perlakuan tambahan, yaitu pemberian CT tanpa SPTAg sehingga diketahui pengaruh CT terhadap respon imun IgG.

DAFTAR PUSTAKA

- Abbas, A.K., A. H. Lichtman, J.S. Pober. 2000. *Cellular and Molecular Immunology*. Philadelphia: W.B. Saunders Company, pp 379 – 408.
- Alexander, J., H. Jebbari, H. Bluethmann, A. Satoskar and C.W. Roberts. 1996. Immunological Control of *Toxoplasma gondii* and Appropriate Vaccine Design. In Gross (Ed.) *Toxoplasma gondii*. Berlin: Springer – Verlag, pp 183 – 195.
- Barackman, J.D., G. Ott and D. T. O'Hagan. 1999. Intranasal immunization of mice with influenza vaccine in combination with the adjuvant LT-R72 induces potent mucosal and serum immunity which is stronger than that with traditional intramuscular immunization. *Infect Immun* 67: 4276 – 4279.
- Biosci.ohio-state.edu/-parasite. January 2003. *Toxoplasma gondii*.
http://www.Biosci.ohio-state.edu/-parasite/more_toxoplasma.html
- Black, M.W and J.C. Boothroyd. 2000. Lytic cycle of *Toxoplasma gondii*. *Microbiol Mol Biol Rev* 64: 607 – 623.
- Bonenfant, C., I. Dimier – Poisson, F. Velge – Roussel, D. Buzoni – Gatel, G. Del Giudice, R. Rappuoli and D. Bout. 2001. Intranasal immunization with SAG1 and non toxic mutant Heat Labile Enterotoxins protects mice against *Toxoplasma gondii*. *Infect Immun* 69 : 1605 – 1612.
- Bourguin, I., M. Moser, D. Buzoni – Gatel, F. Tielemans, D. Bout, J. Urbain and O. Leo. 1998. Murine dendritic cells pulsed in vitro with *Toxoplasma gondii* antigens induce protective immunity in vivo . *Infect Immun* 66: 4867 – 4874.
- Bowman, C.C and J.D. Clements. 2001. Differential biological and adjuvant activities of Cholera Toxin and *Escherichia coli* Heat Labile Enterotoxin hybrids. *Infect Immun* 69: 1528 – 1535.
- Brinkmann, V., J.S. Remington, and S.D. Sharma., 1993. Vaccination of mice with the protective F3G3 antigen of *Toxoplasma gondii* activates CD4+ but not CD8+ T cells and induces toxoplasma spesific IgG antibody. *Mol. Immunol.* 30: 353 – 358.
- Cesbron – Delauw, M.F., L. Lecordier and C. Mercier. 1996. Role of Secretory Dense Granule Organelles in The Pathogenesis of Toxoplasmosis. In Gross (Ed.) *Toxoplasma gondii*. Berlin: Springer – Verlag, pp 59 – 65.
- Chapel, H., M. Haeney, S. Misbah and N. Snowden. 1999. Essential of Clinical Immunology 4th edition. London: Blackwell Science Ltd, pp 801 – 845.

- Dachlan, E. G. 1996. Diagnosis Prenatal Toksoplasmosis Kongenital. Dalam : Seminar Epidemiologi dan Diagnostik Toksoplasmosis Kongenital. Surabaya: TDC - Universitas Airlangga, hlm 23 – 31.
- Darcy, F., H. Gras Masse, M.F. Cesbron, Tatar, and A. Capron. 1992. Protection of mice and nude rats against toxoplasmosis by a multiple antigenic peptide construction derived from *Toxoplasma gondii* P30 antigen. *J. Immunol.* 149: 3636 – 3641.
- Darcy, F. and F. Santoro. 1994. Toxoplasmosis. dalam Kierszenbaum, F. *Parasitic Infection and The Immune System*. London: Academic Press, pp 163 – 201.
- Debard, N., D. Buzoni-Gatel and D. Bout. 1996. Intranasal immunization with SAG1 protein of *Toxoplasma gondii* in association with cholera toxin dramatically reduces development of cerebral cysts after oral infection. *Infect Immun* 64: 2158 – 2166.
- Denkers, E.Y. and R.T. Gazzinelli. 1998. Regulation and function of T – cell – mediated immunity during *Toxoplasma gondii* infection. *Clin Microbiol Rev* 11: 569 – 588.
- Douce, G., M. Fontana, M. Pizza, R. Rappuoli and G. Dougan. 1997. Intranasal immunogenicity and adjuvanticity of site – directed mutant derivatives of cholera toxin. *Infect Immun* 65: 2821 – 2828.
- Dubey, J.P., D.S. Lindsay and C.A. Speer. 1998. Structures of *Toxoplasma gondii* tachyzoites, bradyzoites and sporozoites and biology and development of tissue. *Clin Microbiol Rev* 11: 267 – 299.
- Dubey, J.P and Beatie, C.P. 2002. *Toxoplasmosis of Animal and Man*. Boca Raton, Florida: CRC Press, pp 52.
- Duquesne, V., C. Auriault. F., Darcy, J.P., and A. Capron. 1990. Protection of nude rats against *Toxoplasma* infection by excreted-secreted antigen spesific helper T cells. *Infect. Immun.* 58: 2120 – 2126.
- Elgert, K.D. 1996. *Immunology*. New York: John Wiley and Sons Inc, pp 769 – 962.
- Elson, C.O. and M.T. Dertzbaugh. 1994. Mucosal Adjuvant. dalam Ogra, P.L., M.E. Lamm, J.R. McGhee, J. Mestecky, W. Strober and J. Bienenstock (Eds). *Handbook of Mucosal Immunology*. San Diego: Academic Press, pp 391-402.
- Fischer, H.G., G. Reichmann and U. Hadding. 1996. *Toxoplasma* Proteins Recognized by Protective T Lymphocytes. In Gross (Ed.) *Toxoplasma gondii*. Berlin: Springer – Verlag, pp 175 – 182.

- Fischer, H.G., S. Stachelhaus, M. Salm, H.E. Meyer and G. Reichmann. 1998. GRA7, an excretory 29 kDa *Toxoplasma gondii* dense granule antigen released by infected host cells. *Mol Biochem Parasitol* 91: 251 – 262.
- Fossati – Jimack, L., A. Ioan – Facsinay, L. Reininger, Y. Chicheportiche, N. Watanabe, T. Saito, F.M.A. Hofhuis, J.E. Gessner, C. Schiller, R.E. Schmidt, T. Honjo, J.S. Verbeek and S. Izui. 2000. Markedly different pathogenicity of four immunoglobulin G isotype – switch variants of an antierythrocyte autoantibody is based on their capacity to interact in vivo with the low – affinity Fc γ Receptor III. *J Exp Med* 191: 1293 – 1302.
- Fukuta S, Magnani JL, Twiddy EM, Holmes RK, Ginsburg V. 1988. Comparison of the carbohydrate-binding specificities of cholera toxin and *Escherichia coli* heat-labile enterotoxins LTh-I, LT-IIa, and LT-IIb. *Infect Immun* 56: 1748 – 1753
- Gandahusada, S. 2000. *Toxoplasma gondii* dalam Parasitologi Kedokteran. Edisi Ketiga. Jakarta: Gaya Baru, hlm 153 – 159.
- Gazzinelli, R.T., A. Brezin, Q. Li, R.B. Nussenblatt and C. Chan. 1994. *Toxoplasma gondii*: acquired ocular toxoplasmosis in the murine model, protective role of TNF- α and IFN- γ . *Exp Parasitol* 78: 217 – 229.
- Giuliani, M.M., G. Del Giudice, V. Giannelli, G. Dougan, G. Douce, R. Rappuoli and M. Pizza. 1998. Mucosal adjuvanticity and immunogenicity of LTR72, a novel mutant of *Escherichia coli* heat – labile enterotoxin with partial knockout of ADP – ribosyltransferase activity. *J Exp Med* 187: 1123 – 1132.
- Haumont, M., L. Delhaye, L. Garcia, M. Jurado, P. Mazzu, V. Daminet, V. Verlant, A. Bollen, R. Biemans and A. Jacquet. 2000. Protective immunity against congenital toxoplasmosis with recombinant SAG1 protein in a guinea pig model. *Infect Immun* 68: 4948 – 4953.
- Hazama, M., A. Mayumi-Aono, T. Miyazaki, S. Hinuma, and Y. Fuzisawa. 1993. Intranasal immunization against herpes simplex virus infection by using recombinant glycoprotein D fused with immunomodulating proteins. *Immunology*. 78: 643 – 649.
- Hirabayashi, Y., H. Kurata, H. Funato, T. Nagamine, and T. Kurata. 1990. Comparison of intranasal unokulation of influenza HA vaccine combine with cholera toxin B subunit with oral or parenteral vaccination. *Vaccine* 8: 243 – 248.
- Holliman, R.E. 1996. Toxoplasmosis in Cook, G. (Eds). *Manson's Tropical Diseases 20th*. London: ELBS – W.B. Saunders, pp 251 – 277.

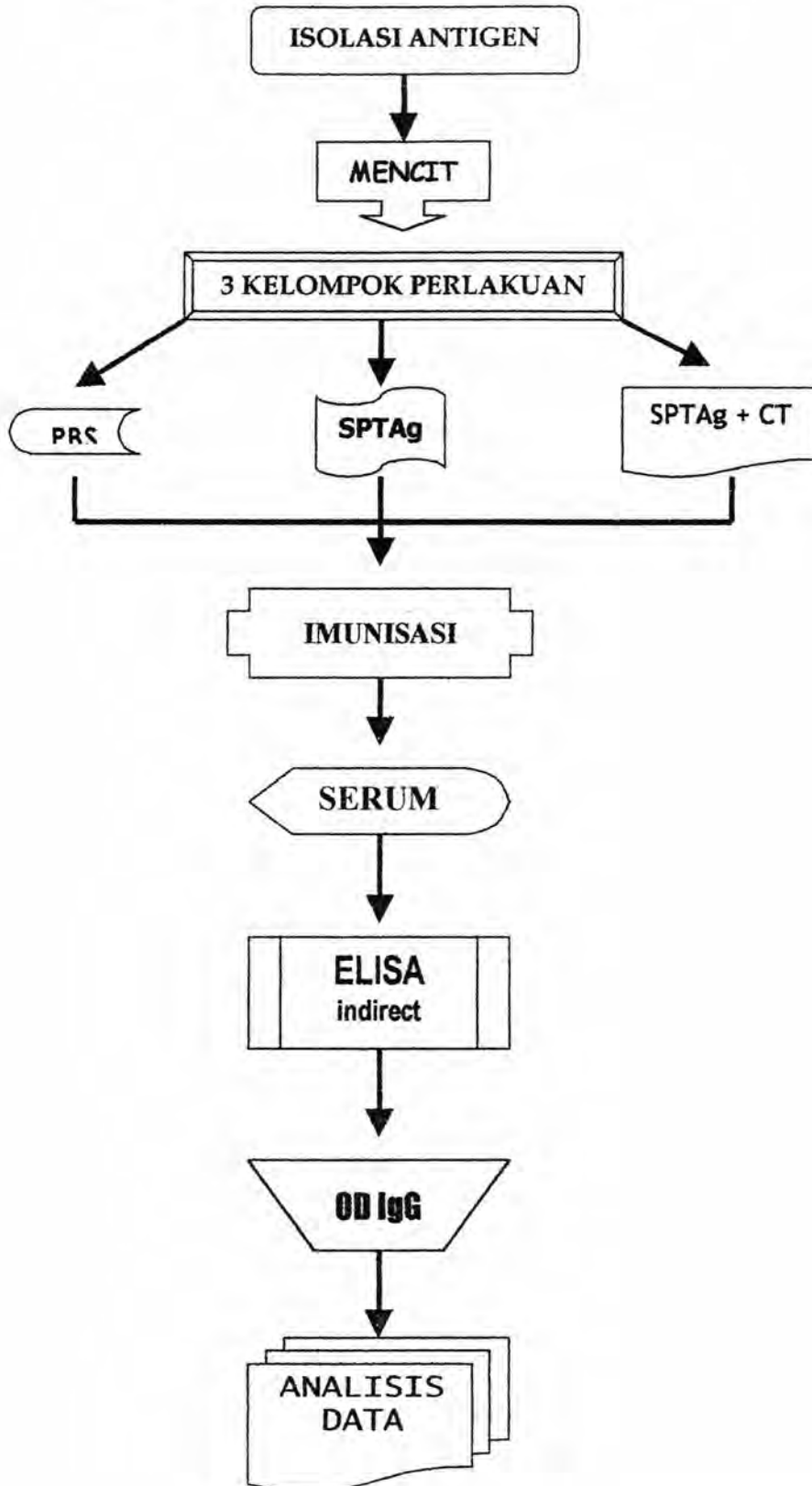
- Holmgren, J. N, Lycke, and C.Czerkinsky. 1993. Cholerae toxin and cholerae B subunit as oral-mucosal adjuvant and antigen vector system. *Vaccine* 11: 1179 – 1184.
- Jacobs , D., M. Vercammen and E. Saman. 1999. Evaluation of recombinant dense granule antigen 7 (GRA7) of *Toxoplasma gondii* for detection of immunoglobulin G antibodies and analysis of a major antigenic domain. *Clin Diagn Lab Immunol* 6: 24 – 29.
- Kasper, LH and D. Buzoni-Gatel., 2001. Ups and Down of Mucosa Cellular Immunity Against Protozoan Parasite. *Infect. Immun.*, 69: 1 – 8.
- Lamenschow, S., Hosmer, DW., Klar, J., and Lwanga, KS., 1990. Adequacy of Sample Size in Health Studies. New York: John Wiley and Sons, pp 104 – 122.
- Lebens, M., V. Shahabi, M. Backstrom, T. Houze, M. Linblad and J. Holmgren. 1996. Synthesis of hybrid molecules between heat – labile enterotoxin and cholera toxin B subunits: potential for use in a broad – spectrum vaccine. *Infect Immun* 64: 2144 – 2150.
- Levine, N. D. 1995. *Protozoologi Veteriner*. Gajah Mada University Press: hlm 354 – 364.
- Martin, M., D.J. Metzger, S.M. Michalek, T.D. Connell and M.W. Russell. 2000. Comparative analysis of the mucosal adjuvanticity of the type II heat – labile enterotoxin LT – IIa and LT – IIb. *Infect Immun* 68: 281 – 287.
- McLeod, R., D. Mack and C. Brown. 1991. *Toxoplasma gondii* – new advances in cellular and molecular biology. *Exp Parasitol* 72: 109 – 121.
- Millar, D.G., T.R. Hirst and D.P. Snider. 2001. *Escherichia coli* heat – labile enterotoxin B subunit is a more potent mucosal adjuvant than its closely related homologue, the B subunit of cholera toxin. *Infect Immun* 69: 3476 – 3482.
- Nguyen, T.D., G. Bigaignon, J. Van Broeck, M. Vercammen, T.N. Nguyen, M. Delmee, M. Turneer, S.F. Wolf and J.P.Coutelier. 1998. Acute and chronic phases of *Toxoplasma gondii* infection in mice modulate the host immune responses. *Infect Immun* 66: 2991 – 2995.
- Prigione, I., P. Facchetti, L. Lecordier, D. Deslee, S. Chiesa, M. Cesbron – Delauw and V. Pistoia. 2000. T cell clones raised from chronically infected healthy humans by stimulation with *Toxoplasma gondii* excretory – secretory antigens cross – react with live tachyzoites: characterization of the fine antigenic specificity of the clones and implications for vaccine development. *J Immunol* 164: 3741 – 3748.

- Kappuoli, R., M. Pizza, G. Douce and G. Dougan. 1999. Structure and mucosal adjuvanticity of cholera and *Escherichia coli* heat – labile enterotoxins. *Immunol Today* 20: 493 – 500.
- Remington, J.S, R. McLeod, and G. Desmonts. 1995. *Toxoplasmosis of the Fetus and Newborn Infant*, 4th ed. W.B. Saunders Company, Philadelphia, pp 140
- Robert, L.S. and J. Janovy. 2000. *Foundations of Parasitology*. Boston: McGraw Hill, pp 127 – 132.
- Sasmita, R. 1988. Peranan Hewan Peliharaan dalam Penularan Toxoplasmosis pada Manusia. *Prosiding Temu Ilmiah Kedokteran Hewan Dalam Rangka Dies Natalis Universitas Airlangga Ke 34*.
- Sayles, P.C., G.W. Gibson and L.L. Johnson. 2000. B cells are essential for vaccination – induced resistance to virulent *Toxoplasma gondii*. *Infect Immun* 68: 1026 – 1033.
- Sears, C.L. and J.B. Kaper. 1996. Enteric bacterial toxins: mechanisms of action and linkage to intestinal secretion. *Microbiol Rev* 60: 167 – 215.
- Scaharton-Kersten, T., Caspar, A. Sher and EY. Denkers. 1996. *Toxoplasma gondii* : Evidence for Interleukin-12 Dependent and Independent Pathways of Interferon γ Production Induced by An Attenuated Parasite Strain. *Exp. Parasitol.*, 84: 102 – 114.
- Smith, J.L. 1999. Foodborne infections during pregnancy. *J Food Protect* 62: 818 – 829.
- Smyth, M.J. and J.A. Trapani. 1995. Granzymes : exogenous proteinases that induce target cell apoptosis. *Immunol Today* 16: 202 – 206.
- Steel, Robert GD., and James H. Torrie. 1991. *Principles and Prosedures of Statistics A Bometrical Approach Ed. 2nd*. New York: McGraw-Hill Book Company. Pp 113 – 119
- Tamura, S.L, Y. Shoji, K.Hasigushi, and T. Kurata. 1994. Effects of cholerae toxin adjuvant on IgE antibody response to orally or nasally administered ovalbumin. *Vaccine* 12: 1238 –1240.
- Tomavo, S. 1996. The Major Surface Proteins of *Toxoplasma gondii*: Structures and Functions. *In* Gross (Ed.) *Toxoplasma gondii*. Berlin: Springer – Verlag, pp 45 – 54.
- Velge – Roussel, F., P. Marcelo, A.C. Lepage, D. Buzoni – Gatel and D.T. Bout. 2000. Intranasal immunization with *Toxoplasma gondii* SAG1 induces protective cell into both NALT and GALT compartments. *Infect Immun* 68: 969 – 972.

- Vercammen, M., T. Scorza, K. Huygen, J. De Braekeleer, R. Diet, D. Jacobs, E. Saman and H. Verschuere. 2000. DNA vaccination with genes encoding *Toxoplasma gondii* antigens GRA1, GRA7, and ROP2 induces partially protective immunity against lethal challenge in mice. *Infect Immun* 68: 38 – 45.
- Wiederman, U., B. Jahn – Schmid, M. Lindblad, C. Rask, J. Holmgren, D. Kraft and C. Ebner. 1999. Suppressive versus stimulatory effects of allergen/cholera toxoid (CTB) conjugates depending on the nature of the allergen in a murine model of type I allergy. *Int Immunol* 11: 1717 – 1724.
- Williams, N.A., T.R. Hirst and T.O. Nashar. 1999. Immune modulation by the cholera – like enterotoxins: from adjuvant to therapeutic. *Immunol Today* 20: 95 – 101.
- Wimer – Mackin, S., R.K. Holmes, A.A. Wolf, W.I. Lencer, and M.G. Jobling. 2001. Characterization of receptor-mediated signal transduction by *Escherichia coli* type IIa heat-labile enterotoxin in the polarized human intestinal cell line T84. *Infect Immun* 69: 7205 – 7212.
- Yap, G.S., T. Scharon – Kersten, D.J.P. Ferguson, D. Howe, Y. Suzuki and A. Sher. 1998. Partially protective vaccination permits the development of latency in a normal virulent strain of *Toxoplasma gondii*. *Infect Immun* 66: 4382 – 4388.
- Zainuddin, M. 2001. Metodologi Penelitian. Surabaya, hlm 73 –79.
- Zhang Y. and EY. Denkers. 1999. Protective Role for Interleukin – 5 During Chronic *Toxoplasma gondii* infection. *Infect. Immun.*, 67: 4383 – 4392.

LAMPIRAN 1

SKEMA PROSEDUR PENELITIAN



Lampiran 2

STATISTIK DESKRIPTIF

Report

Perlakuan (Antigen)		Optical Density IgG mg 1	Optical Density IgG mg 2	Optical Density IgG mg 3	Optical Density IgG mg 4
PBS	Mean	.35340	.3624	.3754	.3720
	Std. Deviation	2.93E-02	4.641E-02	4.337E-02	4.656E-02
	N	5	5	5	5
Ag	Mean	.54240	.5190	.5788	.6460
	Std. Deviation	.10783	7.210E-02	.1011	.5743
	N	5	5	5	5
AgCT	Mean	.45160	.4238	.4970	.3642
	Std. Deviation	.15386	7.066E-02	.1970	3.809E-02
	N	5	5	5	5
Total	Mean	.44913	.4351	.4837	.4607
	Std. Deviation	.12928	8.930E-02	.1484	.3372
	N	15	15	15	15

Lampiran 3

UJI NORMALITAS DISTRIBUSI DATA

NPar Tests

Perlakuan (Antigen) = PBS

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		Optical Density IgG mg 1	Optical Density IgG mg 2	Optical Density IgG mg 3	Optical Density IgG mg 4
N		5	5	5	5
Normal Parameters ^{a,b}	Mean	.35340	.3624	.3754	.3720
	Std. Deviation	2.93E-02	4.641E-02	4.337E-02	4.656E-02
Most Extreme Differences	Absolute	.207	.222	.142	.228
	Positive	.207	.222	.142	.228
	Negative	-.166	-.210	-.126	-.172
Kolmogorov-Smirnov Z		.463	.496	.319	.509
Asymp. Sig. (2-tailed)		.983	.966	1.000	.958

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

c. Perlakuan (Antigen) = PBS

Perlakuan (Antigen) = Ag

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		Optical Density IgG mg 1	Optical Density IgG mg 2	Optical Density IgG mg 3	Optical Density IgG mg 4
N		5	5	5	5
Normal Parameters ^{a,b}	Mean	.54240	.5190	.5788	.6460
	Std. Deviation	.10783	7.210E-02	.1011	.5743
Most Extreme Differences	Absolute	.261	.154	.244	.448
	Positive	.261	.154	.168	.448
	Negative	-.141	-.129	-.244	-.303
Kolmogorov-Smirnov Z		.583	.344	.544	1.001
Asymp. Sig. (2-tailed)		.886	1.000	.928	.268

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

c. Perlakuan (Antigen) = Ag

Perlakuan (Antigen) = AgCT**One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test**

		Optical Density IgG mg 1	Optical Density IgG mg 2	Optical Density IgG mg 3	Optical Density IgG mg 4
N		5	5	5	5
Normal Parameters ^{a,b}	Mean	.45160	.4238	.4970	.3642
	Std. Deviation	.15386	7.066E-02	.1970	3.809E-02
Most Extreme Differences	Absolute	.318	.143	.294	.186
	Positive	.318	.121	.294	.186
	Negative	-.253	-.143	-.242	-.171
Kolmogorov-Smirnov Z		.710	.321	.658	.416
Asymp. Sig. (2-tailed)		.694	1.000	.780	.995

- a. Test distribution is Normal.
 b. Calculated from data.
 c. Perlakuan (Antigen) = AgCT

General Linear Model**Within-Subjects Factors**

Measure: MEASURE_1

WAKTU	Dependent Variable
1	ODIGG1
2	ODIGG2
3	ODIGG3
4	ODIGG4

Perlakuan (Antigen) = PBS**Descriptive Statistics^a**

	Mean	Std. Deviation	N
Optical Density IgG mg 1	.35340	2.9297E-02	5
Optical Density IgG mg 2	.3624	4.641E-02	5
Optical Density IgG mg 3	.3754	4.337E-02	5
Optical Density IgG mg 4	.3720	4.656E-02	5

- a. Perlakuan (Antigen) = PBS

Multivariate Tests^{b,c}

Effect	Value	F	Hypothesis df	Error df	Sig.
WAKTU Pillai's Trace	.199	.165 ^a	3.000	2.000	.911
Wilks' Lambda	.801	.165 ^a	3.000	2.000	.911
Hotelling's Trace	.248	.165 ^a	3.000	2.000	.911
Roy's Largest Root	.248	.165 ^a	3.000	2.000	.911

a. Exact statistic

b.

Design: Intercept
Within Subjects Design: WAKTU

c. Perlakuan (Antigen) = PBS

Tests of Within-Subjects Contrasts^a

Measure: MEASURE_1

Source	WAKTU	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
WAKTU	Linear	1.183E-03	1	1.183E-03	.715	.445
	Quadratic	1.922E-04	1	1.922E-04	.231	.656
	Cubic	1.040E-04	1	1.040E-04	.033	.865
Error(WAKTU)	Linear	6.623E-03	4	1.656E-03		
	Quadratic	3.325E-03	4	8.313E-04		
	Cubic	1.261E-02	4	3.153E-03		

a. Perlakuan (Antigen) = PBS

Tests of Between-Subjects Effects^a

Measure: MEASURE_1

Transformed Variable: Average

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Intercept	2.676	1	2.676	1882.753	.000
Error	5.686E-03	4	1.421E-03		

a. Perlakuan (Antigen) = PBS

Estimated Marginal Means WAKTU

Estimates^a

Measure: MEASURE_1

WAKTU	Mean	Std. Error
1	.353	.013
2	.362	.021
3	.375	.019
4	.372	.021

a. Perlakuan (Antigen) = PBS

Pairwise Comparisons^b

Measure: MEASURE_1

(I) WAKTU	(J) WAKTU	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig. ^a
1	2	-9.000E-03	.032	.790
	3	-2.200E-02	.023	.401
	4	-1.860E-02	.030	.570
2	1	9.000E-03	.032	.790
	3	-1.300E-02	.032	.705
	4	-9.600E-03	.018	.621
3	1	2.200E-02	.023	.401
	2	1.300E-02	.032	.705
	4	3.400E-03	.027	.905
4	1	1.860E-02	.030	.570
	2	9.600E-03	.018	.621
	3	-3.400E-03	.027	.905

Based on estimated marginal means

- a. Adjustment for multiple comparisons: Least Significant Difference (equivalent to no adjustments).
 b. Perlakuan (Antigen) = PBS

Multivariate Tests^b

	Value	F	Hypothesis df	Error df	Sig.
Pillai's trace	.199	.165 ^a	3.000	2.000	.911
Wilks' lambda	.801	.165 ^a	3.000	2.000	.911
Hotelling's trace	.248	.165 ^a	3.000	2.000	.911
Roy's largest root	.248	.165 ^a	3.000	2.000	.911

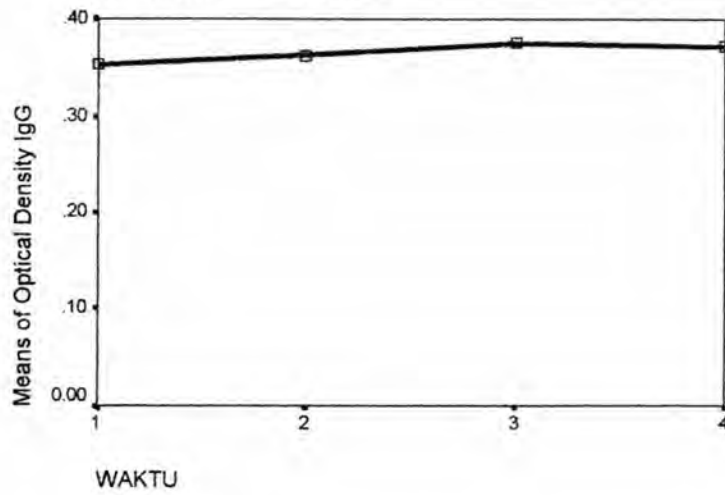
Each F tests the multivariate effect of WAKTU. These tests are based on the linearly independent pairwise comparisons among the estimated marginal means.

- a. Exact statistic
 b. Perlakuan (Antigen) = PBS

Profile Plots

Means of Optical Density IgG

PERLAK: 0 PBS



Perlakuan (Antigen) = Ag**Descriptive Statistics^a**

	Mean	Std. Deviation	N
Optical Density IgG mg 1	.54240	.10783	5
Optical Density IgG mg 2	.5190	7.210E-02	5
Optical Density IgG mg 3	.5788	.1011	5
Optical Density IgG mg 4	.6460	.5743	5

a. Perlakuan (Antigen) = Ag

Multivariate Tests^{b,c}

Effect	Value	F	Hypothesis df	Error df	Sig.
WAKTU Pillai's Trace	.779	2.356 ^a	3.000	2.000	.312
Wilks' Lambda	.221	2.356 ^a	3.000	2.000	.312
Hotelling's Trace	3.533	2.356 ^a	3.000	2.000	.312
Roy's Largest Root	3.533	2.356 ^a	3.000	2.000	.312

a. Exact statistic

b.

Design: Intercept

Within Subjects Design: WAKTU

c. Perlakuan (Antigen) = Ag

Tests of Within-Subjects Contrasts^a

Measure: MEASURE_1

Source	WAKTU	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
WAKTU	Linear	3.434E-02	1	3.434E-02	.199	.678
	Quadratic	1.026E-02	1	1.026E-02	.159	.711
	Cubic	1.436E-03	1	1.436E-03	.073	.801
Error(WAKTU)	Linear	.689	4	.172		
	Quadratic	.259	4	6.473E-02		
	Cubic	7.893E-02	4	1.973E-02		

a. Perlakuan (Antigen) = Ag

Tests of Between-Subjects Effects^a

Measure: MEASURE_1

Transformed Variable: Average

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Intercept	6.533	1	6.533	65.157	.001
Error	.401	4	.100		

a. Perlakuan (Antigen) = Ag

Estimated Marginal Means WAKTU

Estimates^a

Measure: MEASURE_1

WAKTU	Mean	Std. Error
1	.542	.048
2	.519	.032
3	.579	.045
4	.646	.257

a. Perlakuan (Antigen) = Ag

Pairwise Comparisons^b

Measure: MEASURE_1

(I) WAKTU	(J) WAKTU	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig. ^a
1	2	2.340E-02	.028	.450
	3	-3.640E-02	.042	.432
	4	-.104	.276	.726
2	3	-5.980E-02	.027	.089
	4	-.127	.251	.640
3	4	-6.720E-02	.251	.802

Based on estimated marginal means

a. Adjustment for multiple comparisons: Least Significant Difference (equivalent to no adjustments).

b. Perlakuan (Antigen) = Ag

Multivariate Tests^b

	Value	F	Hypothesis df	Error df	Sig.
Pillai's trace	.779	2.356 ^a	3.000	2.000	.312
Wilks' lambda	.221	2.356 ^a	3.000	2.000	.312
Hotelling's trace	3.533	2.356 ^a	3.000	2.000	.312
Roy's largest root	3.533	2.356 ^a	3.000	2.000	.312

Each F tests the multivariate effect of WAKTU. These tests are based on the linearly independent pairwise comparisons among the estimated marginal means.

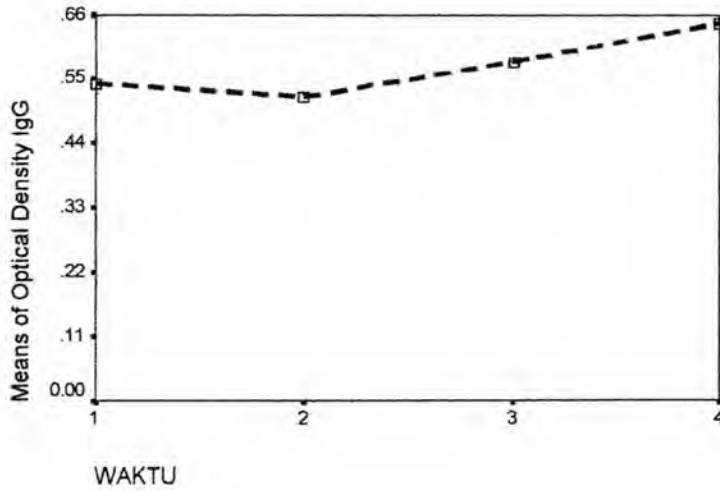
a. Exact statistic

b. Perlakuan (Antigen) = Ag

Profile Plots

Means of Optical Density IgG

PERLAK: 1 Ag



Perlakuan (Antigen) = AgCT**Descriptive Statistics^a**

	Mean	Std. Deviation	N
Optical Density IgG mg 1	.45160	.15386	5
Optical Density IgG mg 2	.4238	7.066E-02	5
Optical Density IgG mg 3	.4970	.1970	5
Optical Density IgG mg 4	.3642	3.809E-02	5

a. Perlakuan (Antigen) = AgCT

Multivariate Tests^{b,c}

Effect	Value	F	Hypothesis df	Error df	Sig.
WAKTU Pillai's Trace	.726	1.767 ^a	3.000	2.000	.381
Wilks' Lambda	.274	1.767 ^a	3.000	2.000	.381
Hotelling's Trace	2.651	1.767 ^a	3.000	2.000	.381
Roy's Largest Root	2.651	1.767 ^a	3.000	2.000	.381

a. Exact statistic

b.

Design: Intercept
Within Subjects Design: WAKTU

c. Perlakuan (Antigen) = AgCT

Tests of Within-Subjects Contrasts^a

Measure: MEASURE_1

Source	WAKTU	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
WAKTU	Linear	8.930E-03	1	8.930E-03	.402	.560
	Quadratic	1.378E-02	1	1.378E-02	.877	.402
	Cubic	2.356E-02	1	2.356E-02	1.150	.344
Error(WAKTU)	Linear	8.875E-02	4	2.219E-02		
	Quadratic	6.285E-02	4	1.571E-02		
	Cubic	8.194E-02	4	2.048E-02		

a. Perlakuan (Antigen) = AgCT

Tests of Between-Subjects Effects^a

Measure: MEASURE_1

Transformed Variable: Average

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Intercept	3.770	1	3.770	357.720	.000
Error	4.215E-02	4	1.054E-02		

a. Perlakuan (Antigen) = AgCT

**Estimated Marginal Means
WAKTU**

Estimates^a

Measure: MEASURE_1

WAKTU	Mean	Std. Error
1	.452	.069
2	.424	.032
3	.497	.088
4	.364	.017

a. Perlakuan (Antigen) = AgCT

Pairwise Comparisons^b

Measure: MEASURE_1

(I) WAKTU	(J) WAKTU	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig. ^a
1	2	2.780E-02	.043	.554
	3	-4.540E-02	.136	.756
	4	8.740E-02	.073	.297
2	3	-7.320E-02	.108	.537
	4	5.960E-02	.034	.152
3	4	.133	.090	.214

Based on estimated marginal means

- a. Adjustment for multiple comparisons: Least Significant Difference (equivalent to no adjustments).
- b. Perlakuan (Antigen) = AgCT

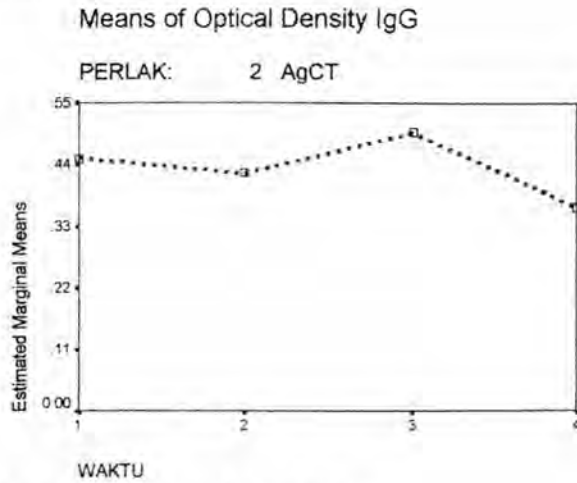
Multivariate Tests^b

	Value	F	Hypothesis df	Error df	Sig.
Pillai's trace	.726	1.767 ^a	3.000	2.000	.381
Wilks' lambda	.274	1.767 ^a	3.000	2.000	.381
Hotelling's trace	2.651	1.767 ^a	3.000	2.000	.381
Roy's largest root	2.651	1.767 ^a	3.000	2.000	.381

Each F tests the multivariate effect of WAKTU. These tests are based on the linearly independent pairwise comparisons among the estimated marginal means.

- a. Exact statistic
- b. Perlakuan (Antigen) = AgCT

Profile Plots



General Linear Model

Within-Subjects Factors

Measure: MEASURE_1

WAKTU	Dependent Variable
1	ODIGG1
2	ODIGG2
3	ODIGG3
4	ODIGG4

Between-Subjects Factors

		Value Label	N
Perlakuan (Antigen)	0	PBS	5
	1	Ag	5
	2	AgCT	5

Descriptive Statistics

	Perlakuan (Antigen)	Mean	Std. Deviation	N
Optical Density IgG mg 1	PBS	.35340	2.9297E-02	5
	Ag	.54240	.10783	5
	AgCT	.45160	.15386	5
	Total	.44913	.12928	15
Optical Density IgG mg 2	PBS	.3624	4.641E-02	5
	Ag	.5190	7.210E-02	5
	AgCT	.4238	7.066E-02	5
	Total	.4351	8.930E-02	15
Optical Density IgG mg 3	PBS	.3754	4.337E-02	5
	Ag	.5788	.1011	5
	AgCT	.4970	.1970	5
	Total	.4837	.1484	15
Optical Density IgG mg 4	PBS	.3720	4.656E-02	5
	Ag	.6460	.5743	5
	AgCT	.3642	3.809E-02	5
	Total	.4607	.3372	15

Multivariate Tests

Effect		Value	F	Hypothesis df	Error df	Sig.
WAKTU	Pillai's Trace	.213	.902 ^a	3.000	10.000	.474
	Wilks' Lambda	.787	.902 ^a	3.000	10.000	.474
	Hotelling's Trace	.271	.902 ^a	3.000	10.000	.474
	Roy's Largest Root	.271	.902 ^a	3.000	10.000	.474
WAKTU * PERLAK	Pillai's Trace	.204	.416	6.000	22.000	.860
	Wilks' Lambda	.805	.381 ^a	6.000	20.000	.882
	Hotelling's Trace	.231	.346	6.000	18.000	.903
	Roy's Largest Root	.160	.586 ^b	3.000	11.000	.636

a. Exact statistic

b. The statistic is an upper bound on F that yields a lower bound on the significance level.

c.

Design: Intercept+PERLAK

Within Subjects Design: WAKTU

Tests of Within-Subjects Contrasts

Measure: MEASURE_1

Source	WAKTU	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
WAKTU	Linear	5.225E-03	1	5.225E-03	.080	.782
	Quadratic	2.993E-04	1	2.993E-04	.011	.918
	Cubic	1.355E-02	1	1.355E-02	.937	.352
WAKTU * PERLAK	Linear	3.922E-02	2	1.961E-02	.300	.746
	Quadratic	2.393E-02	2	1.197E-02	.442	.653
	Cubic	1.156E-02	2	5.778E-03	.400	.679
Error(WAKTU)	Linear	.784	12	6.534E-02		
	Quadratic	.325	12	2.709E-02		
	Cubic	.173	12	1.446E-02		

Tests of Between-Subjects Effects

Measure: MEASURE_1

Transformed Variable: Average

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Intercept	12.540	1	12.540	335.205	.000
PERLAK	.439	2	.220	5.870	.017
Error	.449	12	3.741E-02		

Estimated Marginal Means

1. Perlakuan (Antigen)

Estimates

Measure: MEASURE_1

Perlakuan (Antigen)	Mean	Std. Error
PBS	.366	.043
Ag	.572	.043
AgCT	.434	.043

Pairwise Comparisons

Measure: MEASURE_1

(I) Perlakuan (Antigen)	(J) Perlakuan (Antigen)	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig. ^a
PBS	Ag	-.206	.061	.006
	AgCT	-6.835E-02	.061	.286
Ag	AgCT	.137	.061	.044

Based on estimated marginal means

- a. Adjustment for multiple comparisons: Least Significant Difference (equivalent to no adjustments).

Univariate Tests

Measure: MEASURE_1

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Contrast	.110	2	5.490E-02	5.870	.017
Error	.112	12	9.353E-03		

The F tests the effect of Perlakuan (Antigen). This test is based on the linearly independent pairwise comparisons among the estimated marginal means.

2. WAKTU

Estimates

Measure: MEASURE_1

WAKTU	Mean	Std. Error
1	.449	.028
2	.435	.017
3	.484	.034
4	.461	.086

Pairwise Comparisons

Measure: MEASURE_1

(I) WAKTU	(J) WAKTU	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig. ^a
1	2	1.407E-02	.020	.498
	3	-3.460E-02	.048	.486
	4	-1.160E-02	.096	.905
2	3	-4.867E-02	.039	.233
	4	-2.567E-02	.085	.767
3	4	2.300E-02	.089	.801

Based on estimated marginal means

a. Adjustment for multiple comparisons: Least Significant Difference (equivalent to no adjustments).

Multivariate Tests

	Value	F	Hypothesis df	Error df	Sig.
Pillai's trace	.213	.902 ^a	3.000	10.000	.474
Wilks' lambda	.787	.902 ^a	3.000	10.000	.474
Hotelling's trace	.271	.902 ^a	3.000	10.000	.474
Roy's largest root	.271	.902 ^a	3.000	10.000	.474

Each F tests the multivariate effect of WAKTU. These tests are based on the linearly independent pairwise comparisons among the estimated marginal means.

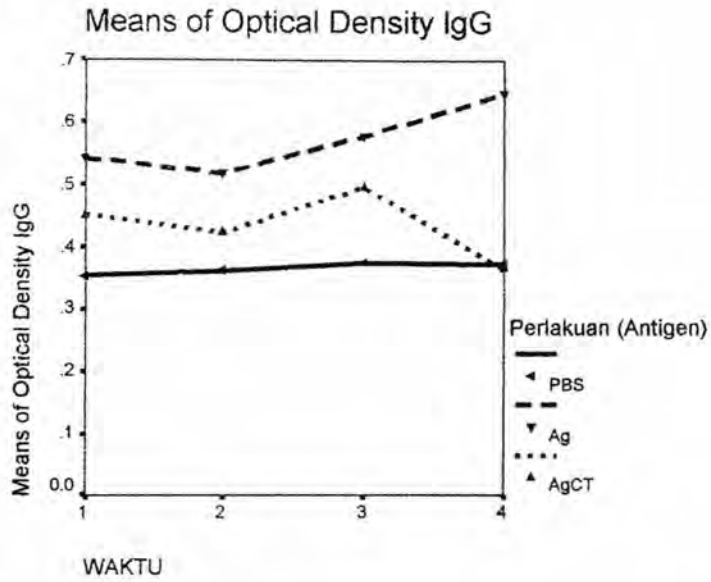
a. Exact statistic

3. Perlakuan (Antigen) * WAKTU

Measure: MEASURE_1

Perlakuan (Antigen)	WAKTU	Mean	Std. Error
PBS	1	.353	.049
	2	.362	.029
	3	.375	.058
	4	.372	.149
Ag	1	.542	.049
	2	.519	.029
	3	.579	.058
	4	.646	.149
AgCT	1	.452	.049
	2	.424	.029
	3	.497	.058
	4	.364	.149

Profile Plots



Lampiran 4

ANOVA SATU ARAH SAMA SUBYEK

Descriptives

		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error
Optical Density IgG mg 1	PBS	5	.35340	2.9297E-02	1.31E-02
	Ag	5	.54240	.10783	4.82E-02
	AgCT	5	.45160	.15386	6.88E-02
	Total	15	.44913	.12928	3.34E-02
Optical Density IgG mg 2	PBS	5	.3624	4.641E-02	2.076E-02
	Ag	5	.5190	7.210E-02	3.224E-02
	AgCT	5	.4238	7.066E-02	3.160E-02
	Total	15	.4351	8.930E-02	2.306E-02
Optical Density IgG mg 3	PBS	5	.3754	4.337E-02	1.940E-02
	Ag	5	.5788	.1011	4.523E-02
	AgCT	5	.4970	.1970	8.810E-02
	Total	15	.4837	.1484	3.832E-02
Optical Density IgG mg 4	PBS	5	.3720	4.656E-02	2.082E-02
	Ag	5	.6460	.5743	.2568
	AgCT	5	.3642	3.809E-02	1.703E-02
	Total	15	.4607	.3372	8.705E-02

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Optical Density IgG mg 1	Between Groups	8.935E-02	2	4.467E-02	3.706	.056
	Within Groups	.145	12	1.205E-02		
	Total	.234	14			
Optical Density IgG mg 2	Between Groups	6.226E-02	2	3.113E-02	7.565	.007
	Within Groups	4.938E-02	12	4.115E-03		
	Total	.112	14			
Optical Density IgG mg 3	Between Groups	.105	2	5.237E-02	3.086	.083
	Within Groups	.204	12	1.697E-02		
	Total	.308	14			
Optical Density IgG mg 4	Between Groups	.258	2	.129	1.159	.347
	Within Groups	1.334	12	.111		
	Total	1.591	14			