

1. TRYPANOSOMA EVANSI

2. ANTIGENIC VARIATION

IR-PERPUSTAKAAN UNIVERSITAS AIRLANGGA

KIK  
Tl 04/01  
Ham  
K

# TESIS

## KARAKTERISASI VARIAN ANTIGENIK *Trypanosoma evansi* HASIL ISOLASI DARI MENCIT FASE AKUT DAN KRONIK

PENELITIAN EKSPERIMENTAL LABORATORIK



IWAN SAHRIAL HAMID  
NIM. 099813091

**PROGRAM PASCA SARJANA  
UNIVERSITAS AIRLANGGA  
SURABAYA**

**2001**

**KARAKTERISASI VARIAN ANTIGENIK *Trypanosoma evansi*  
HASIL ISOLASI DARI MENCIT  
FASE AKUT DAN KRONIK**

**PENELITIAN EKSPERIMENTAL LABORATORIK**

**TESIS**

Untuk memperoleh Gelar magister  
dalam Program Studi Immunologi  
pada Program Pascasarjana Universitas Airlangga

**Oleh :**



**IWAN SAHRIAL HAMID**  
**NIM. 099813091**

**PROGRAM PASCA SARJANA  
UNIVERSITAS AIRLANGGA  
SURABAYA**

**Tanggal, 13 Pebruari 2001**

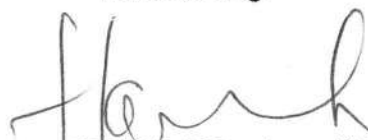
**TESIS INI TELAH DISETUJUI  
TANGGAL, 13 Pebruari 2001**

**Oleh  
Pembimbing Ketua**



**Prof. Dr. Yoes Prijatna Dachlan, Msc., dr.**  
NIP. 130359278

**Pembimbing**



**Dr. Fedik Abdul Rantam, Drh.**  
NIP. 131653434

**Mengetahui**

**Ketua Program Studi Ilmu Imunologi  
Program Pascasarjana Universitas Airlangga**



**Dr. Fedik Abdul Rantam, Drh.**  
NIP. 131653434

Telah diuji pada

Tanggal, 13 Pebruari 2001

PANITIA PENGUJI TESIS

Ketua : Prof. Dr. Soegeng Soegijanto, SpAK, dr.

Anggota : 1. Prof. Dr. Yoes Prijatna Dachlan, MSc., dr.

2. Dr. Fedik Abdul Rantam, Drh.

3. Sri Agus Sudjarwo, Ph.D., Drh.

4. Dr. Hario Puntodewo, Mapp.Sc., Drh.

## UCAPAN TERIMA KASIH

Pertama-tama saya panjatkan puji syukur kehadirat Allah S.W.T. Yang Maha Pengasih lagi Maha Penyanyang atas segala rahmat dan karuniaNya, sehingga tesis ini dapat diselesaikan.

Terima kasih tak terhingga dan penghargaan yang setinggi-tingginya saya sampaikan kepada Prof. Yoes Prijatna Dachlan, MSc. dr. sebagai Pembimbing Ketua yang dengan perhatian telah memberikan dorongan, bimbingan dan saran hingga terselesainya tesis ini.

Terima kasih sebesar-besarnya dan penghargaan yang tinggi saya sampaikan kepada Dr. Fedik Abdul Rantam, Drh. sebagai Ketua Program Studi Imunologi yang dari awal hingga akhir pendidikan telah memberikan bimbingan belajar penelitian dan kesempatan, yang baik untuk menyelesaikan studi saya, termasuk tesis ini.

Saya sampaikan terima kasih kepada Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi melalui Tim Manajemen Program Master Pascasarjana Universitas Airlangga yang telah memeberikan bantuan finansial selama masa studi hingga meringankan beban selama dalam menyelesaikan tesis ini.

Dengan selesainya tesis ini, pekenankanlah saya menyampaikan terima kasih kepada :

Rektor Universitas Airlangga Prof. H. Soedarto, dr., DTMH., Ph.D. atas kesempatan dan fasilitas yang diberikan selama Program Magister. Direktur program Pascasarjana Universitas Airlangga yang telah memberikan kesempatan untuk mengikuti Program Magister. Dekan Fakultas Kedokteran Hewan Dr. Ismudiono, M.S., Drh. yang telah memberikan kesempatan untuk mengikuti program Magister.

Saya sampaikan pula terima kasih sebesar-besarnya kepada segenap Tim Penguji yang telah memberikan informasi, kritik dan saran demi perbaikan kualitas tesis ini.

Saya sampaikan terima kasih dan rasa bangga saya kepada keluarga (istri dan anak) yang telah memberikan dorongan moril demi terselesaikannya tesis ini.

## RINGKASAN

**KARAKTERISASI VARIAN ANTIGENIK *Trypanosoma evansi*  
HASIL ISOLASI DARI MENCIT FASE AKUT DAN KRONIK**

Trypanosomosis merupakan penyakit yang disebabkan oleh genus trypanosoma, salah satunya adalah penyakit *surra* yang disebabkan oleh *trypanosoma evansi*. Penyakit ini merupakan penyakit endemik di beberapa daerah di Indonesia, menyerang ternak sapi, kerbau, kuda dan kambing. Sehingga akibat penyakit ini menimbulkan kerugian ekonomi yang cukup besar.

Penanggulangan penyakit ini sangat sulit, karena parasit trypanosoma mempunyai kemampuan merubah karakteristik antigen permukaan selama menginfeksi induk semang. Strategi yang dikembangkan untuk menghindarkan diri dari respon imun. Perubahan karakteristik antigen permukaan menimbulkan varian antigenik, yaitu suatu hasil seri dari antigenik yang berbeda diantara populasi trypanosoma pada waktu tertentu.

Penelitian ini bertujuan untuk indentifikasi dan karakterisasi varian antigenik *T. evansi* yang di isolasi dari mencit fase akut dan kronik. Diketuainya varian antigenik dapat dipakai sebagai petanda intensitas penyakit (kronik atau akut), untuk menunjang diagnosis.

Telah dilakukan penelitian terhadap 60 ekor mencit (*mus musculus*) strain BALB/c yang terbagi dalam tiga kelompok, terdiri dari 20 ekor mencit fase akut diinokulasi oleh  $10^6$  *T. evansi* dan 20 ekor mencit fase kronik ringan serta 20 ekor mencit fase kronik berat inokulasi oleh  $10^3$  *T. evansi*. Setelah menunjukkan gejala klinis akut dan kronik dilakukan isolasi parasit dari darah. Selanjutnya dilakukan perhitungan parasitemia dan karakterisasi protein antigenik engan metode SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrilamid Gel Electroforesis).

Hasil penelitian menunjukkan terdapat perbedaan nyata ( $p < 0,05$ ) jumlah parasitemia antara mencit fase akut dan kronik. Terdapat gambaran pita-pita fraksi protein yang berbeda pada gel elektroforesis antara fase akut dan kronik. Perbedaan tersebut dapat dipakai sebagai petanda imunologik intensitas suatu penyakit.

## SUMMARY

### THE CHARACTERIZATION OF *Trypanosoma evansi* ANTIGENIC VARIANT ISOLATED RESULT OF MICE ON ACUTE AND CHRONIC PHASES

Trypanosomosis is a diseases caused by genus *Trypanosoma*, one of them is surra disease caused by *Trypanosoma evansi*. In some region of Indonesia, this disease is an endemic disease, that spread rapidly and attacked cattle, buffaloes, horses and goats. Because of this disease, we suffered a lot of economic loss.

The control of this disease is very difficult, because *Trypanosoma* parasites have the ability to change the surface of antigen characteristic during the infected host. It is the developed strategy to avoid the immune response. The change of the antigen characteristic surface the antigenic variant. That is the series result of different antigenics between *Trypanosoma* population on the fixed time.

This research intends to identity and characterize *T. evansi* antigenic variant isolated from the acute and chronic mice phase. It is known that antigenic variant can be used as the indication of the disease intensity (acute or chronic) to support the diagnosis.

The research used go mice (*mus musculus*) strain BALB/c divided into three groups each consists of 20 mice on an acute phase inoculated by  $10^6$  *T. evansi*, 20 mice in minor chronic phase and 20 severe chronic mice inoculated by  $10^3$  *T. evansi*. After indicating acute and chronic clinical symptoms, we isolated parasites from the blood. And than we calculated parasitemia and characterized antigenic protein with SDS – PAGE (Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrylamid Gel Electroforesis) Method.

The result of this research showed that there was the real different ( $p < 0,05$ ) about the number of parasitemia between mice on the acute and chronic phases. There was a description of different protein fraction bands on electrophorese gel between acute and chonic phase. The different can be used as indication of the imunologic intensity of a desease.

Key words : *T. evansi* , antigenic variant, acute and chronic phase.

## DAFTAR ISI

	Halaman
Sampul Depan .....	i
Sampul Dalam .....	ii
Persyaratan Gelar .....	iii
Persetujuan .....	iv
Penetapan Panitia Penguji .....	v
Ucapan Terima Kasih .....	vi
Ringkasan .....	vii
Summary .....	viii
Daftar Isi .....	ix
Daftar Tabel .....	xi
Daftar Gambar .....	xii
<b>BAB 1 PENDAHULUAN</b> .....	1
1.1 Latar Belakang Penelitian .....	1
1.2 Rumusan Masalah .....	4
1.3 Tujuan Penelitian .....	4
1.4 Manfaat Penelitian .....	5
<b>BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA</b> .....	6
2.1 <i>Trypanosoma evansi</i> .....	6
2.1.1 Klasifikasi <i>T. evansi</i> .....	7
2.1.2 Morfologi <i>T. evansi</i> .....	9
2.1.3 Biologi <i>T. evansi</i> .....	10
2.1.4 Cara Penularan dan Hewan-hewan Rentan .....	11
2.1.5 Patogenesis dan Gejala Klinik .....	13
2.2 Varian Antigenik .....	15
2.3 Imunitas pada Trypanosomosis .....	18
2.4 Infeksi fase akut Trypanosomosis .....	20
2.5 Infeksi fase kronik Trypanosomosis .....	22
<b>BAB 3 KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN</b> .....	24
3.1 Kerangka Konseptual .....	24
3.2 Hipotesis Penelitian .....	26
<b>BAB 4 METODE PENELITIAN</b> .....	27
4.1 Tempat Dan Waktu Penelitian .....	27
4.2 Hewan Percobaan .....	27
4.3 Isolat <i>T. evansi</i> .....	28
4.4 Identifikasi Variabel .....	29
4.4.1 Variabel Bebas .....	29
4.4.2 Variabel Tergantung .....	29



4.4.3	Variabel Kendali .....	29
4.5	Definisi Operasional Variabel .....	29
4.6	Rancangan Penelitian .....	30
4.7	Perlakuan pada Hewan Percobaan .....	30
4.8	Isolasi <i>T. evansi</i> .....	33
4.9	SDS-PAGE .....	34
<b>BAB 5</b>	<b>HASIL PENELITIAN</b> .....	36
5.1	Parasitemia.....	36
5.2	Berat Molekul Varian Antigenik <i>T. evansi</i> .....	38
<b>BAB 6</b>	<b>PEMBAHASAN</b> .....	48
6.1	Deteksi Parasitemia .....	48
6.2	Varian Antigenik Pada <i>T-evansi</i> .....	51
<b>BAB 7</b>	<b>KESIMPULAN DAN SARAN</b> .....	57
7.1	Kesimpulan.....	57
7.2	Saran .....	58
	<b>DAFTAR PUSTAKA</b> .....	59
	<b>LAMPIRAN</b>	

## DAFTAR TABEL

	<i>Halaman</i>
Tabel 5.1. <i>Trypanosoma evansi</i> pada hari ke 5 setelah infeksi untuk fase akut, hari ke 35 setelah infeksi untuk fase kronik ringan dan hari ke 48 setelah infeksi untuk fase kronik berat .....	36
Tabel 5.2. Jumlah Pita-pita Protein Antigenik pada Gel Elektroforesis dari Mencit Fase Akut Trypanosomosis	41
Tabel 5.3. Jumlah Pita-pita Protein Antigenik yang Tampak pada Gel Elektroforesis dari Mencit Fase Kronik Ringan Trypanomosis .....	44
Tabel 5.4. Jumlah Pita-pita Protein Antigenik yang Tampak pada Gel Elektroforesis dari Mencit fase Kronik Berat Trypanomosis .....	46
Table 5.5. Sebaran Sampel yang Menampakkan Pita Protein Antigenik pada Semua Fase Infeksi trypanomosis ....	47

## DAFTAR GAMBAR

	<i>Halaman</i>
Gambar 2.1. Morfologi <i>T. evansi</i> .....	9
Gambar 5.1. Hasil Pengamatan Varian Antigenik <i>T. evansi</i> Isolasi dari Fase Akut dengan Metode SDS- PAGE sampel no. 1 – 7 .....	38
Gambar 5.2. Hasil Pengamatan Varian Antigenik <i>T. evansi</i> Isolasi dari fase akut dengan metode SDS-PAGE sampel no. 8 – 13 .....	39
Gambar 5.3. Hasil Pengamatan Varian Antigenik <i>T. evansi</i> Isolasi dari Fase Kronik Ringan dengan Metode SDS-PAGE sampel 1 – 7 .....	41
Gambar 5.4. Hasil Pengamatan Varian Antigenik <i>T. evansi</i> Isolasi dari Fase Kronik Ringan dengan Metode SDS-PAGE sampel 8 – 14 .....	42
Gambar 5.5. Hasil Pengamatan Varian Antigenik <i>T. evansi</i> Isolasi dari Fase Kronik Berat dengan Metode SDS-PAGE sampel 1 – 7 .....	44
Gambar 5.6. Hasil Pengamatan Varian Antigenik <i>T. evansi</i> Isolasi dari Fase Kronik Berat dengan Metode SDS-PAGE sampel 8 – 14 .....	45

**DAFTAR LAMPIRAN**

*Halaman*

Data Analisis Parasitemia dari Isolasi Mencit Infeksi Fase Akut,  
Kronik ringan dan Kronik Berat .....

**DAFTAR SINGKATAN**

VSG	: Variant Surface Glycoprotein
VAT	: Variable Antigenic Type
GPI – PLC	: Glycosylphosphatidylinositol Specific Phospholipase C
kDa	: kilo Dalton
CRPs	: Complements Regulatory Proteins
IL	: Interleukin
TNF $\alpha$	: Tumor Necrosis Factor alpha
CSFs	: Colony Stimulating Factor
DAF	: Decay Accelerating Factor
CR1	: Complement Receptor type 1
DCMs	: Double Cell Membranes
MoAb	: Monoclonal Antibody
SDS-PAGE	: Sodium Dodecyl Sulphate-Polyacrylamid Gel Electrophoresis
PBS-G	: Phosphate Buffer Saline-Glucose
IFN $\gamma$	: Interferon gamma
FP	: Flagellar Pocket
NK	: Natural Killer
TGF 5	: Transforming Growth Factor 5
XO	: Xanthine Oxidase
GM – CSF	: Granulocyte Macrophage – Colony Stimulating Factor

# BAB 1

## PENDAHULUAN



### 1.1 Latar Belakang Penelitian

Salah satu penyakit pada ternak besar yang perlu mendapat perhatian adalah surra atau trypanosomosis. Surra menyerang sapi, kuda, dan kerbau yang disebabkan oleh parasit protozoa yaitu *Trypanosoma evansi* (*T. evansi*). Melalui hasil pengamatan dilapangan didapatkan data bahwa telah terjadi kasus surra dengan dua aspek penularan yang berbeda, dimana satu pihak merupakan penularan akibat masuknya hewan yang sakit dan pada aspek lain berasal dari penularan secara endemik sporadik ( Anonimus, 1988 )

Upaya pengendalian penyakit surra tergolong sulit disebabkan oleh beberapa hal yaitu (1) Sifat biologis *Trypanosoma evansi* yang mudah menjadi resisten terhadap obat-obatan *tripanocide*. (2) Banyaknya jenis hewan rentan, dan menjadi sumber penularan (diantaranya yang telah diketahui adalah onta , sapi, kerbau, domba, kuda, anjing, tikus, mencit, kelinci, babi, dan gajah), serta banyaknya jenis vektor (contoh, Tabanus, Stomoxys, Lyperosia). (3) Cara penularan yang mudah, dimana *T. evansi* dapat dipindahkan sebagai bentuk infeksi dari satu hewan ke hewan lainnya tanpa mengalami perubahan siklus (*mechanically transmitted form*),

bahkan dilaporkan penyakit ini dapat ditularkan melalui kopulasi pada kuda (Soulsby, 1986).

Sebagai upaya seperti tersebut di atas telah diteliti sejak lama, namun karena sifat biologis trypanosoma yang dianggap sangat penting sebagai penyebab timbulnya resistensi terletak pada kemampuannya untuk terus-menerus mengubah sifat antigenik permukaan dinding selnya. Lapisan Glikoprotein atau yang secara khusus disebut *variant surface glycoprotein* (VSG) yang membentuk dinding sel parasit dapat berubah-ubah sehingga menyulitkan hewan yang terserang untuk mengatasi infeksi melalui sistem kekebalannya. VSG ini dapat berubah setiap 5 - 7 hari sekali dan hasilnya adalah *Variable Antigenic Type* (VAT) yang baru (Fred, 1997). Hal inilah yang menyebabkan timbulnya gelombang parasitemia yang terus-menerus (naik turun), dan merupakan ciri khas dari infeksi trypanosoma. Turunnya jumlah parasitemia selalu disertai dengan meningkatnya antibodi hewan, kemudian disusul dengan meningkatnya parasitemia kembali dengan antigenik yang berbeda. Diketahui bahwa perubahan pada VSG trypanosoma dikendalikan oleh gen. Terdapat lebih dari 1000 gen yang mengendalikan VSG pada *T. brucei*, dimana setiap gen akan mengkode satu jenis VSG yang diekspresikan pada waktu yang berbeda (Kuby, 1994).

Penelitian yang dilakukan oleh Singh, *et al*, 1995 yang mengamati hasil karakterisasi polipeptida dan antigen pada sel membran dan flagellar *T. evansi* yang diambil dari tujuh strain yang ditemukan di India. Sejumlah antigen pada sel membran pada strain yang berbeda dapat dipakai Hiperimun Serum homolog dan heterolog yang bervariasi antara 3 dan 11 polipeptida dengan berat molekul antara 25-98 kDa. Sedangkan sejumlah antigen flagellar pada strain yang berbeda antara 13 dan 14 polipeptida dengan berat molekul 17-98 kDa. Ini mengindikasikan kemungkinan variabilitas antigenik yang rendah diantara ketujuh strain. Disamping faktor strain maka yang juga mengidentifikasi perbedaan karakterisasi varian antigenik adalah faktor intensitas infeksi yaitu akut dan kronik. Hal ini sesuai dengan hasil penelitian yang dilakukan oleh Authie (1994). Dimana terdapat perbedaan, berat molekul protein antigen dengan analisis western blot, pada sapi N'Dama tipe taurin yang bersifat trypanotoleran serta infeksi berlangsung kronis menunjukkan berat molekul antigen trypanosoma sebesar 33 kDa yang sama sekali tidak dimiliki oleh sapi-sapi boran tipe zebu yang bersifat rentan serta infeksi berlangsung akut.

Dengan diketahuinya varian antigenik yang berbeda pada intensitas infeksi akut dan kronik diharapkan dapat dipakai sebagai



petanda dari suatu intensitas penyakit dalam menunjang diagnosis infeksi *T. evansi*.

## 1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang penelitian, maka dapat diambil suatu rumusan masalah, yaitu :

- a. Bagaimana karakteristik Varian antigenik *T. evansi* yang diisolasi dari mencit fase akut dan kronik.
- b. Apakah terdapat perbedaan jumlah parasitemia *T. evansi* yang diisolasi dari mencit fase akut dan kronik.
- c. Apakah terdapat perbedaan variasi antigenik *T. evansi* yang diisolasi dari mencit fase akut dengan fase kronik.

## 1.3 Tujuan Penelitian

### 1.3.1 Tujuan Umum

Penelitian ini secara umum bertujuan untuk mengetahui petanda intensitas suatu infeksi oleh *T. evansi*, apakah infeksi tersebut bersifat akut atau kronik, dengan harapan dapat dipakai sebagai pedoman dalam penanggulangan penyakit yang disebabkan oleh *T. evansi*.

### 1.3.2 Tujuan Khusus

Penelitian ini mempunyai tujuan khusus untuk :

1.3.2.1 Identifikasi dan karakterisasi varian antigenik *T. evansi* yang diisolasi dari mencit fase akut dan kronik.

1.3.2.2 Mengetahui perbedaan varian antigenik *T. evansi* antara yang diisolasi dari mencit fase akut dengan kronik.

#### 1.4 Manfaat Penelitian

Manfaat yang dapat diperoleh pada penelitian ini adalah :

##### 1.4.1 Manfaat Teoritik :

Memberikan informasi ilmiah tentang intensitas infeksi penyakit yang disebabkan oleh *T. evansi* dalam menunjang penanggulangan penyakit.

##### 1.4.2 Manfaat Metodologik :

Memberikan landasan ilmiah yang kuat dalam penelitian biologi molekuler untuk maksud pengontrolan trypanosomosis dalam pengembangan metode diagnostik.

##### 1.4.3 Manfaat Aplikatif :

Dengan diketahuinya intensitas infeksi melalui gambaran varian antigenik dapat dilakukan pengembangan imunoterapi trypanosomiasis melalui penggunaan hiperimun serum atau antibody monoklonal, serta imunoprolifaksis dengan menggunakan vaksin.

## BAB 2

### TINJAUAN PUSTAKA

#### 2.1 *Trypanosoma evansi*

*T. evansi* juga merupakan salah satu spesies penyebab trypanosomosis pada hewan ternak yang dikenal dengan penyakit surra, secara ekonomis sangat merugikan ternak sapi, domba, kuda dan unta akibat kematian dan penurunan berat pada hewan-hewan tersebut ( Ngeranwa *et al*, 1993 ).

Kecepatan penyebaran penyakit didukung oleh vektor yang di temukan dalam pengamatan berupa lalat *Tabanus*, *Hippobosca* dan *Lyperosia*. Penularan ini terjadi terjadi secara mekanik, serangga-serangga tersebut hanya berdaya memindahkan penyakit kurang lebih selama empat jam ( Ressang, 1984 ).

Di Indonesia penyakit surra pertama kali dilaporkan oleh Penning pada tahun 1897 yang menyerang seekor kuda di Semarang, dan pada tahun 1957 penyakit ini dilaporkan telah tersebar luas di seluruh wilayah Indonesia. Kasus-kasus surra biasanya terjadi secara sporadik tetapi kadang kala merupakan suatu wabah yang membawa dampak kerugian ekonomi yang sangat besar, sebagai akibat tingginya angka morbiditas dan mortalitas pada hewan yang terinfeksi (Anonimus, 1981).

### 2.1.1 Klasifikasi *T. evansi*

Klasifikasikan *Trypanosoma evansi* adalah sebagai berikut :

Fillum	: Protozoa
Sub fillum	: Mastigophora
Klas	: Zoomastigophora
Sub klas	: Sarcomastigophora
Ordo	: Kinetoplastida
Sub ordo	: Trypanosomatida
Famili	: Trypanosomatidae
Genus	: Trypanosoma
Sub genus	: Trypanozoon
Spesies	: <i>Trypanosoma evansi</i>

Nama lain dari *T. evansi* antara lain *T. anamnese*, *T. barberum*, *T. hippicum*, *T. soundanense* dan *T. venezualence*. Genus trypanosoma dapat dibagi menjadi dua kelompok besar berdasarkan cara ditularkannya, yaitu :

Kelompok Stercoaria (Posterior Station Group; Lewisi Group; Group A). Dengan ciri-ciri morfologi : Kinetoplast besar dan tidak terletak diujung (terminal), ekstrimitas posteriornya lonjong, memiliki flagella bebas dan undulating membrannya tidak berkembang baik. Pada kelompok ini pembelahan terjadi pada tubuh induk semang, dalam bentuk *trypomastigote*, *epimastigote*, *promastigote* atau *amastigote* (tahapan lengkap perkembangan trypanosoma). Memiliki habitat pada ujung posterior dan ditularkan melalui feces dari vektor (arthropoda). Sifatnya sedikit mengkonsumsi gula darah dan cyanida yang dihasilkan menghambat konsumsi oksigen. Kelompok ini dibagi menjadi empat subgenus yaitu,

*Megatrypanum* (*T. theleria*, *T. melophagium*), *Herpetosoma* (*T. lewisi*, *T. duttoni*, *T. nabiasi*), *Schizotrypanum* (*T. cruzi*, *T. rangeli*, *T. avium*) dan subgenus *Endotrypanum*.

Kelompok Salivaria (Anterior Station Group; Group B). Ciri-ciri morfologi : Kinetoplast lebih pendek dan terletak terminal atau subterminal, ekstremitas posteriornya tumpul, tidak memiliki flagella bebas, undulating membranya sangat berkembang. Dengan ciri-ciri biologisnya yaitu, pembelahan terjadi pada induk semang dalam bentuk trypomastigote (tidak ada perkembangan siklus), dapat ditularkan tanpa mengalami perubahan siklus (*Mechanically transmitted non cyclically*) bentuk infektif (trypomastigote) terletak pada ujung anterior dan ditularkan melalui gigitan, seringkali sangat patogenik serta dibagi menjadi empat subgenus yaitu, *Duttonella* (*T. vivax*, *T. uniforme*), *Nannomonas* (*T. congolense*, *T. dimorphon*, *T. simiae*), *Pycomonas* (*T. suis*), dan *Trypanozoon*. Selanjutnya subgenus *Trypanozoon* dibagi menjadi dua subgroup berdasarkan sifat biologisnya yaitu : Mengalami perubahan siklus pada saluran pencernaan dan kelenjar liur dari vektor (*Glossina* sp.) contoh *T. brucei*, *T. rhodensia*, *T. gambesia*. Tidak mengalami perkembangan siklus dalam tubuh vektor. Contoh *T. equiperdum*, dan *T. evansi* (Soulsby, 1986).

Mempunyai *karyoplasma* yang kasar berbutir-butir dimana ditengahnya ditemukan anak inti (*nukleolus*). Dilaporkan bahwa *tripanocide* Barenil selain efektif membunuh *T. evansi* strain Bali, juga dapat merubah sifat biologik pada parasit yang masih hidup, dengan akibat menurunnya patogenitas parasit. Perubahan sifat biologik ini disebabkan karena adanya perubahan morfologis parasit, yang terutama perubahan pada mitokondria, retikulum endoplasma dan kinetoplast. Yang paling menarik adalah hilangnya kinetoplast dan membran ganda yang mengelilinginya sebagai suatu komponen mitokondria. (Göbel dan Denning, 1992). Menurut Soulsby (1986), *T. evansi* memiliki inti yang vesikuler. Badan neuromotor terdiri dari basal granule atau blepharoplast adalah sebagai awal munculnya axoneme. Melalui *electron micrograph* diketahui bahwa axoneme merupakan calon dari flagella dan terdiri dari dua sabut sentral dan sembilan sabut tepi.

### 2.1.3 Biologi *T. evansi*

*T. evansi* berkembang biak dengan cara membelah diri (*Binary or multiple fussion*), pembelahan dimulai dari kinetoplast yang diikuti oleh nukleus dan kemudian sitoplasma. Dalam satu species *T. evansi* dapat memiliki perbedaan pada bentuk dan panjangnya, tetapi kebanyakan bentuk infektifnya adalah pipih.

Perubahan yang terjadi pada metabolisemenya akan diikuti oleh perubahan pada morfologinya. Diyakini terdapat hubungan antara perkembangan mitokondria dengan perubahan pada bentuk dan metabolisemenya. Pada bentuk darah (*blood forms*) *T. brucei* mengkatabolisme tak sempurna sebagian besar heksosa menjadi piruvat. Dalam keadaan anaerob trypanosoma akan mengkatalisis glukosa secara sempurna menjadi CO<sub>2</sub> dan H<sub>2</sub>O. Melalui pengamatan sitokimia diketahui bahwa semua sistem oksidasi dilakukan pada mitokondria.

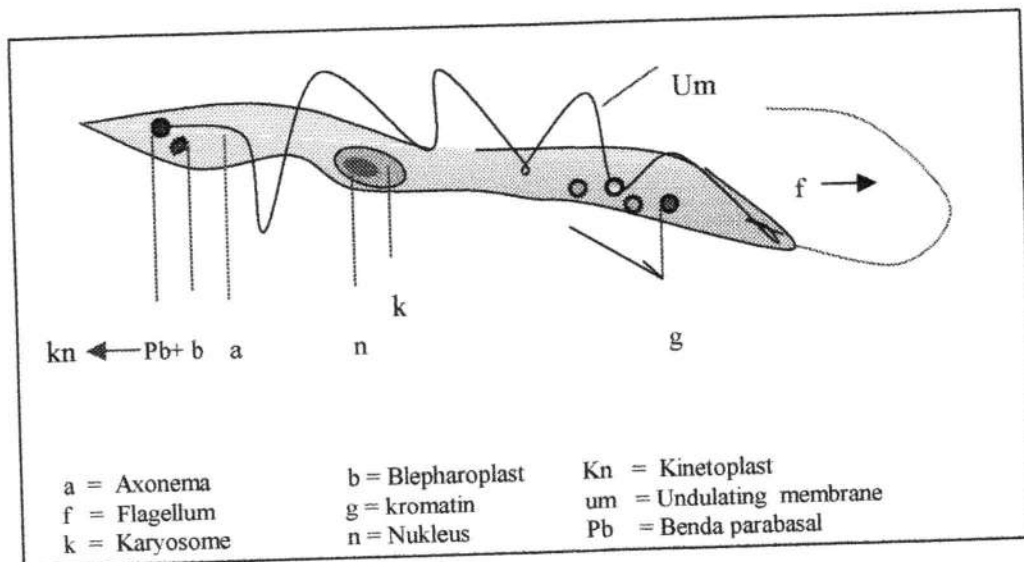
Pada tubuh induk semang, *T. evansi* dapat menghindarkan diri dari respon humoral dengan cara selalu mengganti sifat antigeniknya, fenomena ini diketahui pertamakali pada tahun 1910 oleh Ross dan Thomson, karena adanya gelombang parasitemia yang berulang dengan selang beberapa hari. Pada setiap gelombang, fase naik ditandai dengan jumlah parasitemia yang tinggi dan antigenik yang baru, sedangkan pada fase turun didapatkan perusakan sejumlah parasit oleh antibodi. Hal ini menjelaskan sifat perssten parasit pada hewan yang terinfeksi. Antigen-antigen yang bertanggung jawab pada infeksi berulang (*relapse infections*) ini disebut *variant antigens* (Soulsby, 1986).

#### **2.1.4 Cara Penularan dan Hewan-Hewan Rentan**

Saat ini penyebaran *T. evansi* dapat ditemukan di seluruh kawasan India, Timur Jauh, Asia Tenggara, Afrika Utara, Amerika Tengah dan

### 2.1.2 Morfologi *T. evansi*

*T. evansi* tergolong mikroorganisme bersel tunggal yang mempunyai dinding inti (*Unicellular eukariotik microorganism*) (Kuby, 1994). Berdasarkan ada tidaknya kinetoplast, dapat dibagi menjadi dua jenis yaitu, yang mempunyai dan tidak mempunyai kinetoplast. Pengamatan perbandingan struktur (*fine structure*) dari *T. evansi* secara garis besar sukar dibedakan antara strain Bali dan Kairo. Parasit berbentuk relatif memanjang dan dibungkus oleh selaput (membran) setebal 9 nm, pada strain Bali terdapat flagella dan kantong flagella yang membujur dibawah mikrotubuli subvehikel dengan diameter 25 nm. Kantong flagella mengandung bagian intra seluler flagella. Flagella yang berasal dari kantong flagella keluar didaerah leher. Lilitan yang berulang-ulang memberi beberapa titik singgung yang kontak dengan badan sel parasit, dan dihubungkan dengan badan sel tersebut dengan *desmosom* (Göbel dan Denning, 1992).



**Gambar 2.1.** Morfologi *T. evansi*

Sumber : Levine, (1985)



Selatan. Pindahannya terutama dilakukan oleh golongan lalat penggigit seperti *Stomoxys*, *Tabanus*, dan *Lyperosia*. Pada proboscis parasit lalat tidak bertahan lebih dari 10-15 menit (Soulsby, 1986). Menurut Koesdarto (1998), kemampuan hidup *T. evansi* pada habitat proboscis *Tabanus rubidus* maksimal 4 jam, sedangkan pada habitat fore gut dapat mencapai maksimal 9 jam.

Dalam tubuh vector, tidak ditemukan perkembangan siklus, lalat-lalat tersebut memindahkan secara mekanik dari satu hewan ke yang lainnya. Di Amerika Selatan kelelawar (vampir) juga berperan sebagai vector (Soulsby, 1986). Menurut Ressang (1984), lalat *Chrysops*, *Haematopota*, *Mucidae*, serta jenis caplak *Ornithodoros* dapat menjadi vektor. Pada beberapa kasus, parasit ini dapat ditularkan per oral melalui karkas hewan yang terinfeksi, seperti yang terjadi pada anjing dan melalui kopulasi pada kuda.

Onta adalah hewan paling rentan oleh parasit ini, perjalanan penyakit dapat akut atau kronis dan sering kali berakhir dengan kematian. Hewan-hewan lain yang rentan adalah kuda, anjing, sapi, kerbau, gajah, babi, tapir, kucing, rusa, kelompok rodent laboratorium seperti mencit, tikus, kelinci, dan guinea-pig (Soulsby, 1986).



### 2.1.5 Patogenesis dan Gejala klinik

Menurut Losos dan Ikede, (1972) Patogenitas pada tripanosomiasis ditentukan oleh spesies trypanosoma, strain diantara spesies, serta jenis induk semang. Selain menyebabkan anemia, serangan trypanosoma juga akan menyebabkan degenerasi dan nekrotik, serta reaksi inflamasi. Selain itu serangan oleh parasit ini menunjukkan gejala yang beragam pada berbagai jenis hewan dan trypanosoma penyebabnya. Beberapa akibat infeksi tersebut antara lain ditandai oleh meningkatnya volume plasma, total protein, gamma globulin, trombositopenia, meningkatnya total lipid serum, dan viskositas darah, serta menurunnya kadar albumin.

Telah diketahui bahwa pada umumnya patogenitas pada tripanosomiasis disebabkan oleh mekanisme immunologis. Anemia yang menjadi ciri utama akibat infeksi parasit ini, juga diyakini berkaitan dengan reaksi antigen-antibodi. Kerentanan sel darah merah terhadap fagositosis makrofag, diakibatkan melekatnya antigen trypanosoma pada permukaan sel darah merah. Proses opsonisasi ini juga melibatkan sejumlah komplemen.

Selain itu patogenitas trypanosomiasis juga dikarenakan oleh aktivasi senyawa –senyawa mediator inflamasi oleh parasit. Pada infeksi yang cukup parah diketahui kadar kinin darah meningkat, dimana proses kejadiannya sama dengan reaksi *anafilaksis shock* yang melibatkan reaksi antigen dan

antibodi. Kadar kinin darah yang tertinggi diketahui terjadi selama beberapa hari pada hewan yang terinfeksi *T. brucei*. Peningkatan kadar kinin ini menyebabkan meningkatnya permeabilitas darah yang selanjutnya akan menyebabkan oedema, selain itu juga meningkatnya suhu badan, dan meningkatkan akumulasi leukosit arteri kecil (Soulsby, 1986).

Pada kejadian surra yang menyerang sapi dan kerbau di Banyuwangi Jawa-Timur, hewan menampakkan gejala berupa naiknya suhu tubuh, lesu, lekas lelah, nafsu makan turun. Apabila hewan dapat bertahan maka parasitemia dapat ditemukan hingga bertahun-tahun. Pada keadaan yang lebih parah maka akan terjadi oedema pada dagu dan anggota gerak bawah, anemia, emasi, bulu rontok, ikterus, dan keluarnya lendir terutama dari hidung dan mata. Apabila parasit sampai pada cairan cerebrospinal maka akan nampak gejala-gejala syaraf yaitu ; hewan berjalan sempoyongan, kejang-kejang, serta berputar-putar (Anonimus, 1988).

Kuda bisa mati dalam beberapa jam sampai beberapa bulan setelah infeksi tergantung dari jenis strain. Dengan menunjukkan gejala oedema (pada leher, kaki dan bagian bawah tubuh), luka nekrosis pada kulit (dollar spot), haemorrhagis (pada batas antara kulit dan mukosa membran terutama pada hidung, mata dan anus, emasi, demam berseling, . Keadaan pasca mati ditandai dengan anemia, pembesaran kelenjar limfa, dan kelenjar limfatik serta splenomegaly. Petechia ditemukan pada parenkim hati, ginjal,

serta permukaan selaput lendir (Soulsby, 1986). Pada anjing dan kucing memperlihatkan gejala berupa : demam selang-seling, anemia, rinitis, busung air, *kerato iriditis*, emiasi, urtikaria, dan splenomegaly, biasanya nafsu makannya tetap (Ressang, 1984). Hasil pengamatan Salva *et al*, (1995), menunjukkan bahwa Gejala – gejala klinis pada kuda yang menderita surra, yaitu : demam, anemia, conjungtivitis, oedem pada leher bagian bawah tubuh, penurunan kondisi secara umum, dan terjadinya abortus pada hewan betina

Gambaran histopatologik pada beberapa hewan penderita surra juga dilaporkan oleh Ngeranwa *et al.*, ( 1993 ), diantaranya berupa hiperpelasi jaringan limpa atropi.muskuler, foki-foki nekrotik pada hati, ginjal, kelenjar limfe dan paru, bronkopneumonia, penurunan jumlah limfosit, destruksi hepatosit yang ditandai infiltrasi sel-sel radang pada liver, kelenjar limfe dan ginjal.

## 2.2 Varian Antigenik

*Trypanosoma evansi*, umumnya sama dengan kelompok salivarian trypanosoma yang lain, yaitu mempunyai kemampuan merubah karakteristik antigen permukaan selama terjadinya paparan pada vertebrata ( Jones, 1984). Strategi yang dikembangkan untuk pertahanan tersebut adalah menghindarkan diri dari serangan

perangkat imun. Antigen permukaan berfungsi sebagai mantel protein yang menutupi seluruh sel, termasuk flagella yang tersusun secara homogen dari satu macam glikoprotein. Glikoprotein ini merupakan antigen permukaan sel yang sewaktu-waktu dapat dirubah apabila perangkat pertahanan imun sudah mengenalnya. Strategi seperti itu dikenal dengan istilah varian antigenik (Artama, 1992). Varian antigenik tampaknya merupakan suatu hasil seri antigenik yang berbeda diantara populasi trypanosoma pada setiap waktu tertentu, biasanya setiap 4-5 hari selama infeksi. Hal ini yang diistilahkan dengan tipe-tipe varian antigenik atau VATs (*Variant Antigenic Types*). Total jumlah VATs yang dapat dihasilkan selama infeksi trypanosoma belum banyak diketahui tetapi berdasarkan hasil penelitian biokimiawi diperkirakan sekitar 1000 VATs (Jones, 1984).

Setiap perubahan VATs ditandai dengan fluktuasi parasitemia yang begitu karakteristik, dimana meningkatnya jumlah trypanosoma dalam peredaran darah perifer. Sebaliknya hilangnya parasit dalam peredaran darah perifer berarti eliminasi populasi tersebut. Dalam proses ini sistem imun tidak sekalipun mampu mengeliminasi populasi parasit secara total, sehingga trypanosoma yang tertinggal sempat berkembang membentuk populasi baru dengan antigen

permukaan yang lain dari sebelumnya. Demikian seterusnya terjadi berulang-ulang sampai pada akhirnya perangkat imun induk semangnya tidak lagi mampu membendung populasi yang sedang berkembang dan akhirnya mengakibatkan kematian penderita.

Variasi antigen seperti itu diatur secara genetik. Dalam genom dari trypanosoma diketahui terdapat beberapa ratus gen untuk *variant surface glycoprotein* (VSG), yang silih berganti dapat diaktivasi, tetapi hanya satu yang diekspresikan pada suatu waktu. VSG yang diekspresikan pada permukaan sel secara simultan dibentuk oleh struktur N – linked oligosaccharida dan GPI anchor glycans (Zitzmann, 2000). GPI anchor glycans yang melekat pada membran plasma sel parasit mengikat VSG. Tetapi sebelumnya pembentukan VSG dipicu oleh GPI-PLC (*Glycosylphosphatidylinositol specific phospholipase C*) yang terletak tersembunyi intraseluler (De Almeida *et.al*, 1999).

Hasil karakterisasi varian antigenik oleh Steverding, et al, (1994) dengan SDS-PAGE menunjukkan bahwa, VSG T. Brucei yang berhasil diidentifikasi mempunyai berat molekul 42 kDa. Sedangkan VSG yang dimodifikasi oleh GPI-anchor mempunyai berat molekul antara 50-60 kDa.

### 2.3. Imunitas Pada Trypanosomosis

Ikatan IgE dengan pompa ATPase yang terdapat pada plasma membran trypanosoma tidak membunuh parasit tetapi mencegah proliferasi dari parasit. Keadaan ini berlangsung beberapa minggu, sebelum terbentuk antibodi baru ( IgM ), yang mengenal ablastin ( IgE ) lalu terbentuk kompleks H-ATPase pada permukaan membran trypanosoma. Kemudian mengaktivasi komplemen dan terjadi lisis dengan cepat dari trypanosoma.

Trypomastigot diselubungi glikoprotein ( 160 kDa ) yang secara biokimiawi dan genetik berhubungan dengan *Complements regulatory Proteins* ( CRPs ) mamalia, yang berguna untuk mencegah lisis oleh komplemen. Protein ini merupakan faktor H, DAF, CR1, yang membagi afinitas ikatan untuk komponen dari jalur alternatif dan klasik seperti C3 konvertase, C3b, dan C4b (Merrals, 1998)

CRPs *T. cruzi* DAF merupakan membran glikoprotein dengan distribusi yang tersebar luas pada permukaan sel dan melekat pada permukaan membran sel melalui GPI (Glicosyl Phosphatidyl Inositol) DAF terikat C3b dan C4b yang keduanya merupakan pengatur jalur alternatif dan klasik komplemen. Peningkatan aktifitas C3 berhubungan dengan tingginya level parasitemia pada

kelinci yang diinfeksi dengan *T. evansi*, ditegaskan pula bahwa aktivasi C3 memainkan peran yang menentukan dalam mengontrol parasitemia, karena lisis parasit tergantung komplemen, ini merupakan satu prinsip cara eliminasi parasit dari host.

Pada eksperimen evaluasi jalur aktivasi C3 dengan mengumpulkan serum dari kelinci yang diinfeksi dengan *T. evansi*, aktivasi jalur klasik lebih dominan oleh komponen yang stabil dari parasit mungkin penting pada hewan yang terinfeksi. Khusus pada aktivasi jalur alternatif, pada periode dimana repon antibodi host mengalami penurunan sebagai hasil dari variasi antigenik. Secara invitro mekanisme makrofag terikat tripanosoma ditunjukkan yang mana antibodi harus terikat pada antigen tripanosoma yang membawa pesan ke fagosit untuk mengenal antigen (Merralls, 1998).

*African trypanosoma* dapat dirusak oleh makrofag. Selanjutnya dalam infeksi bila terjadi opsonisasi dengan antibodi dan C3b, mereka dibawa oleh makrofag ke liver lebih cepat. Mereka juga menyimpan molekul-molekul yang mengatur respon inflamasi diantaranya IL-1, IL-12, TNF $\alpha$ , dan CSFs.

Respon imun berikutnya dijelaskan oleh Uzonna, *et al*, (1999) dalam penelitiannya yang membedakan respon imun mencit strain



BALB/c dengan C57BL/c. Pada hari keempat setelah infeksi dengan *T. congolense*, splenosit mensekresi IL-4, IL-10 dan IFN $\gamma$  dengan level yang tinggi pada BALB/c. Sebaliknya pada C57BL/c level IL-4 tidak terdeteksi, sedangkan sekresi IL-10 dan IFN $\gamma$  dideteksi pada hari keenam dan berangsur turun kadarnya pada hari kedelapan ketika pertama kali gelombang parasitemia diamati. Pada hari keenam sampai kedelapan splenosit C57BL/c mensekresi IL-12 yang kadarnya dua kali lebih tinggi dibanding BALB/c. Sebagai respon imun terhadap VSG setelah infeksi pada BALB/c diawali peningkatan IgM, kemudian pada puncak parasitemia yang pertama dideteksi IgG2a dan IgG2b, sedangkan IgG1 dan IgG3 dideteksi pada akhir infeksi (Radwanska, *et al*, 2000). Infeksi terhadap C57BL/c memberikan respon kuat terhadap IgG2 dan IgG3. Peningkatan resistensi *T. congolense* pada mencit kemungkinan diperantarai IL-12 yang tergantung sintesis IgG2 terhadap VSG.

#### **2.4. Infeksi Fase Akut Trypanosomosis**

Beratnya penyakit bervariasi, tergantung dari spesies dan umur hewan terinfeksi dan juga spesies trypanosoma yang menginfeksi gejala klinis pada infeksi primer meliputi, demam intermitten, anemia, penurunan berat badan yang diperberat oleh faktor nutrisi

dan stress. Pada kasus akut ditandai dengan ptokia pada membran serosa, khususnya peritoneal, bengkak pada limpa dan kelenjar limfe. Penderita yang mengalami infeksi akut akan mati beberapa hari hingga beberapa minggu (Losos, 1985).

Menurut Morison, *et al*, 1981, tanda klinis pada sapi penderita akut adalah diawali febris pada parasitemia derajat tinggi, disusul septikemia dan haemoragis masif sampai terjadi kematian setelah 2 minggu atau 6-10 minggu. Menurut Levine (1985), infeksi *T. evansi* pada kuda dan keledai kematian akan terjadi antara 15 hari hingga 4 bulan dengan diawali gejala demam, oedema pada abdomen, genital dan pangkal paha. Kematian akan terjadi setelah penderita mengalami paralisis lumbal.

Pada tikus yang terinfeksi *T. lewisi* dapat tahan hidup hingga 4-5 minggu dengan derajat parasitemia tertinggi ( $\pm$  5-7 hari) setelah penularan. Gejala yang dapat diamati antara lain lesia artikularis tibia tarsal dengan mengeluarkan eksudat, pada pemeriksaan jaringan tempat terdapat lesia dan peradangan muskulatur maupun pada sub kutan (Flynn, 1973).

Pada hewan laboratorium (tikus) bila terjadi infeksi akut dapat mati dalam waktu relatif cepat tanpa memperlihatkan gejala patoknomonik (Losos, 1985). Hal tersebut mirip laporan penelitian

menunjukkan gejala pada kualitas bulu yang rendah tampak kerontokan, mukosa mata anemis dan adanya gejala persyarafan. Flynn (1973) Memaparkan bahwa gejala ikutan yang dapat diamati bila tikus bertahan hingga 4-5 minggu adalah eritema dan oedema pada ekstremitas bahkan dapat timbul oedema purulen. Sedangkan Brochu (1999) melaporkan bahwa pada mencit fase kronik menunjukkan gejala syaraf yang berat terutama persyarafan otonomik, hal tersebut dihubungkan dengan dihasilkannya dalam banyak molekul proinflamatori di susunan syaraf pusat.

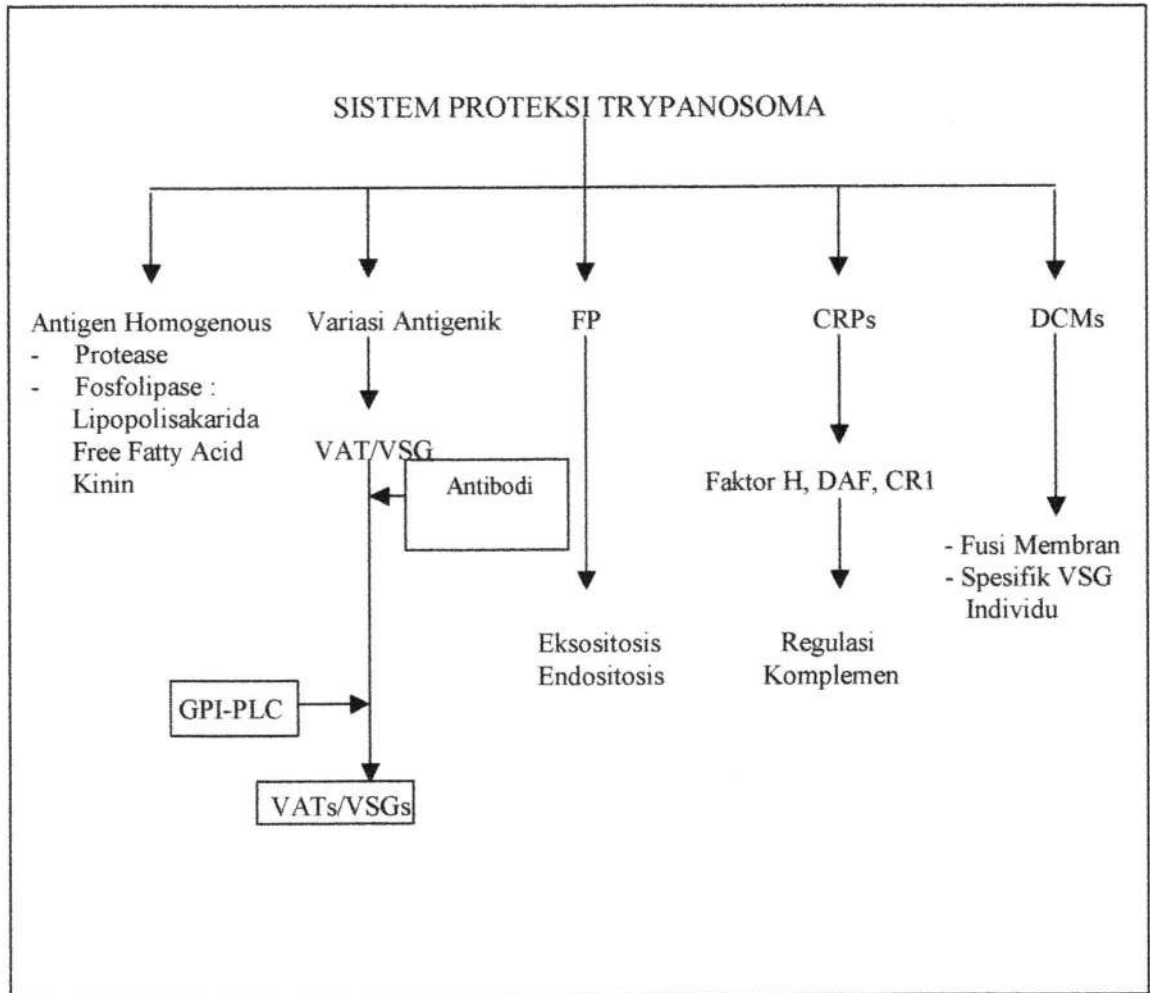
Ramirez *et al* (1994), melaporkan hasil penelitiannya tentang pengamatan parasitologik pada hamster yang diinfeksi *T. cruzi*, infeksi fase kronik dilakukan dengan menginokulasikan trypanosoma sejumlah 35.000 intra peritoneal. Lesi-lesi terjadi pada beberapa jaringan dan organ, tetapi respon inflamatori kurang dan dikarakterisasi adanya infiltrasi mononuklear dengan lokal atau zonal fibrosis pada miokardium sapi terjadinya gagal jantung yang ditandai dengan asites peritoneal.

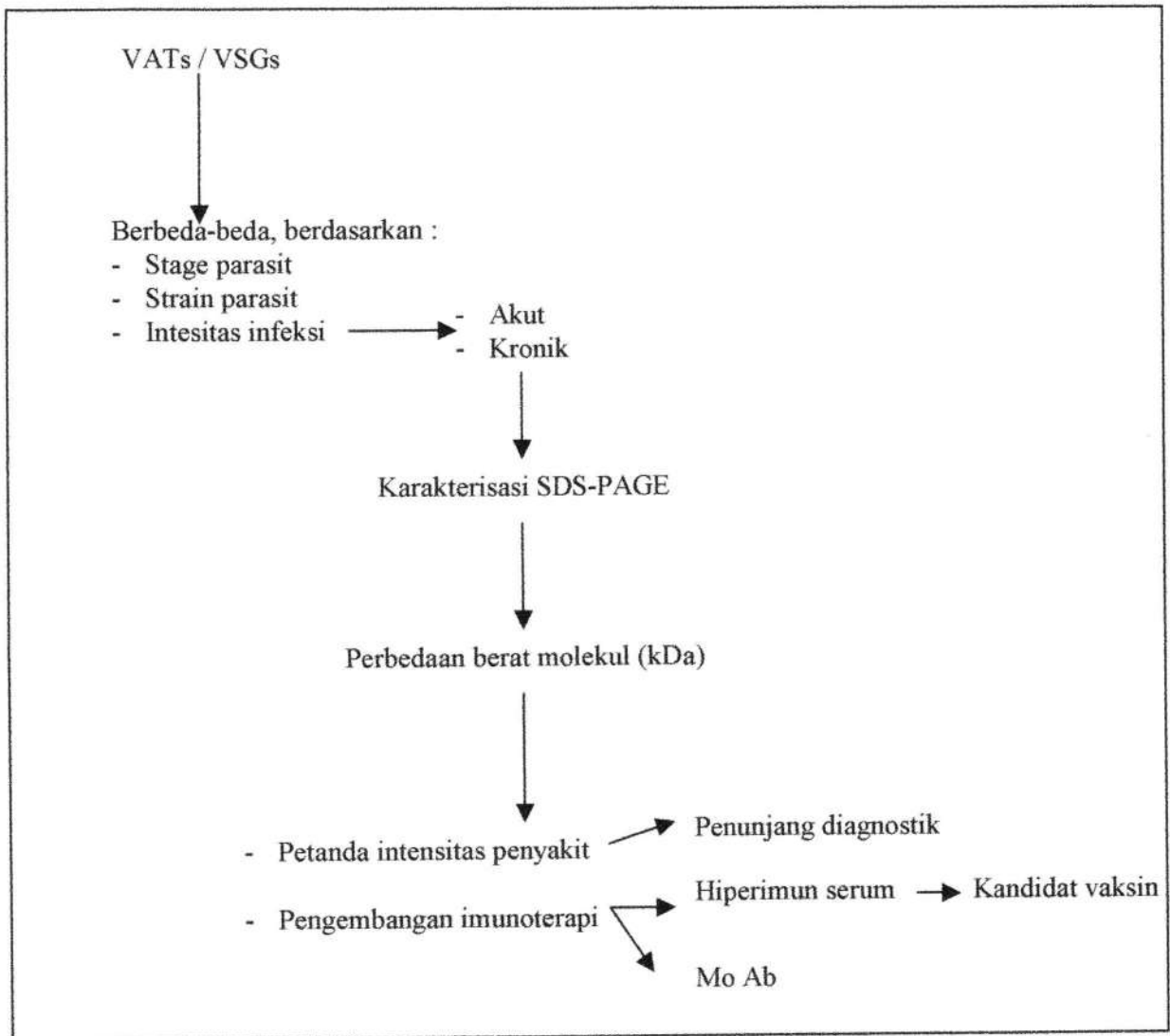


**BAB 3**

**KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN**

**3.1 KERANGKA KONSEPTUAL**



**Keterangan :**

- VAT** : **Variant Antigenik Type**  
**VSG** : **Variant Surface Glycoprotein**  
**GPI-PLC** : **Glycosyl Phosphatidyl inositol – Phospholipase C**  
**FP** : **Flagellar Pocketc**  
**CRP<sub>S</sub>** : **Complement Regulatory Proteins**  
**DCM<sub>S</sub>** : **Double Cell Membranes**  
**M<sub>0</sub>Ab** : **Monoclonal Antibody**

### 3.2 Hipotesis Penelitian

Pada penelitian ini dapat ditarik hipotesis, yaitu :

- Karakteristik varian antigenik *T. evansi* yang diisolasi dari mencit fase akut dan kronik berupa pita-pita pada gel elektroforesis SDS – PAGE.
- Adanya perbedaan jumlah parasitemia *T. evansi* hasil isolasi dari mencit fase akut dan fase kronik.
- Terdapat perbedaan berat molekul (kDa) protein antigenik antara trypanosoma yang diinokulasikan fase akut dengan fase kronik pada mencit.

Ismu dkk, 1992, yang memaparkan terjadinya kematian 3 – 5 hari setelah infeksi.

Pengamatan pada hamster yang diinfeksi fase akut *T. evansi* telah dilaporkan oleh Ramirez, 1994, bahwa hamster yang diinokulasi *T. evansi* sejumlah  $10^5$  dan diamati dengan interval 24 jam, terjadi reaksi inflamatori yang dikarakterisasi adanya infiltrasi mononuklear dan polimorponuklear pada sebagian besar jaringan dan organ, khususnya jaringan lemak dan otot.

## **2.5. Infeksi Fase Kronik Trypanosomosis**

Intensitas infeksi kronis pernah dilaporkan sebagai hasil pengamatan oleh Authie (1994) pada sapi N'Dama tipe taurine di padang penggembalaan yang banyak ditemukan lalat yang terinfeksi trypanosoma. Sapi-sapi tersebut mempunyai kemampuan mempertahankan jumlah parasit yang rendah dalam darahnya, derajat anemia yang terus menurun, tampak kurus dan produktivitasnya rendah. Hal ini disebabkan oleh dosis infeksi yang rendah memberikan kontribusi intensitas kronik di bawah paparan alami.

Pada hewan laboratorium seperti mencit pernah dilaporkan oleh Muchson (1993), bahwa pada mencit yang terinfeksi kronis

## BAB 4

### METODE PENELITIAN

#### 4.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di beberapa tempat yaitu :

- Kandang hewan percobaan Fakultas Kedokteran Hewan Unair, sebagai tempat pemeliharaan hewan percobaan.
- Laboratorium virologi Tropical Disease Centre (TDC) Unair, sebagai tempat analisis fraksi protein dengan SDS-PAGE.
- Laboratorium parasitologi Fakultas Kedokteran Hewan Unair, sebagai tempat pemeriksaan parasit *T. evansi*.

Waktu penelitian yang direncanakan selama empat bulan, mulai Juli-Nopember tahun 2000.

#### 4.2 Hewan Percobaan

Hewan percobaan yang digunakan adalah mencit Strain BALB/c, jenis kelamin betina dengan umur rata-rata dua bulan, rata-rata berat badan 22,5 gram (range 20-25 gram). Jumlah mencit yang digunakan sebanyak 30 ekor terbagi dalam tiga kelompok perlakuan. Jadi masing-masing perlakuan 10 ekor. Hewan percobaan tersebut diperoleh dari pengembangbiakan hewan percobaan Pusat Veterinaria Farma (Pusvetma). Hewan percobaan



diaklimatisasi pada kondisi kandang, pakan, dan minum, yang sama. Pemberian pakan dan minum secara *ad libitum*.

#### 4.3. Isolat *Trypanosoma evansi*

Isolat *T. evansi* yang digunakan adalah strain lokal Banyuwangi-Jatim kode isolat 209/Bakit 475 yang didapat dari koleksi laboratorium parasitologi Balai Penelitian Veteriner (Balitvet) Bogor. Jumlah *T. evansi* yang diinokulasikan pada hewan percobaan sebanyak  $10^6$  untuk infeksi akut dan  $10^3$  untuk infeksi kronik. (Ramirez, et al., 1994)

- *T. evansi* dihitung dengan memakai hemositometer seperti melakukan perhitungan sel darah putih.
- Darah dari mencit diencerkan dengan *Phosphat Buffer Saline-Glucose* (PBS-G) dengan pengenceran 1 : 1000 dengan tingkat parasitemia positif 4 (lebih dari 20 *T. evansi* dalam satu lapang pandang mikroskop dengan pembesaran 400 kali).
- Dari pengenceran tersebut diambil dengan pipet lekosit dan ditetaskan pada gelas obyek *Improved Neubauer* yang memiliki kamar hitung.

Rumus penghitungan:

$X/4 \times 10^4 \times 10^3$  (pengenceran) = jumlah *T. evansi* per mililiter

X = jumlah *T. evansi* yang dihitung pada empat kamar hitung.

#### 4.4 Identifikasi variabel

##### 4.4.1 Variabel bebas

Jumlah *Trypanosoma evansi* yang diinfeksi pada mencit untuk menimbulkan kondisi akut atau kronik.

##### 4.4.2 Variabel tergantung

- a. Derajat parasitemia pada fase akut dan kronik
- b. Respon klinik yang ditimbulkan pada fase akut dan kronik
- c. Gambaran pita-pita protein antigenik dari *T. evansi* hasil isolasi pada mencit fase akut dan kronik.

##### 4.4.3 Variabel kendali

- a. Jenis hewan percobaan, umur, jenis kelamin, berat badan, diet dan jenis parasit.
- b. Cara pemeriksaan dan pengukuran derajat parasitemia
- c. Cara karakteristik dengan SDS-PAGE

#### 4.5 Definisi operasional variabel

- a. Parasitemia: keadaan dimana didaptkannya parasit (*T. evansi*) di dalam darah.
- b. Fase akut : tahap perjalanan infeksi suatu penyakit (trypanosomosis) yang segera menunjukkan gejala klinik dan kematian relatif cepat.

- c. Fase kronik : Tahap perjalanan infeksi suatu penyakit (trypanosomosis) yang ditandai dengan gejala klinik yang berjalan relatif lama.
- d. SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulphate-Polyacrilamid Gel Electrophorese) : merupakan suatu metode yang dapat digunakan untuk mendeteksi fraksi protein berdasarkan berat molekulnya.

#### 4.6 Rancangan Penelitian

Pada penelitian ini dilakukan pengelompokan hewan percobaan menjadi tiga kelompok berdasarkan intensitas infeksi oleh *trypanosoma evansi*, yaitu : fase akut, kronik ringan dan kronik berat. Seleksi intensitas infeksi tersebut didasarkan atas pengamatan pada gejala klinik, dimana sebelumnya dilakukan perlakuan dengan menyuntikkan *T. evansi* sebanyak  $10^6$  untuk mencit kelompok I dan *T. evansi* sebanyak  $10^3$  untuk kelompok II dan III dilakukan pengamatan gejala klinik sampai menunjukkan fase kronik ringan dan berat.

#### 4.7 Perlakuan Pada Hewan Percobaan

Perlakuan pada hewan percobaan meliputi :

- 60 ekor mencit Strain BALB/c di bagi dalam tiga kelompok, yaitu kelompok I sejumlah 20 ekor yang diinfeksi fase akut dan kelompok II sejumlah 40 ekor yang diinfeksi fase kronik, terbagi dalam 2 kelompok

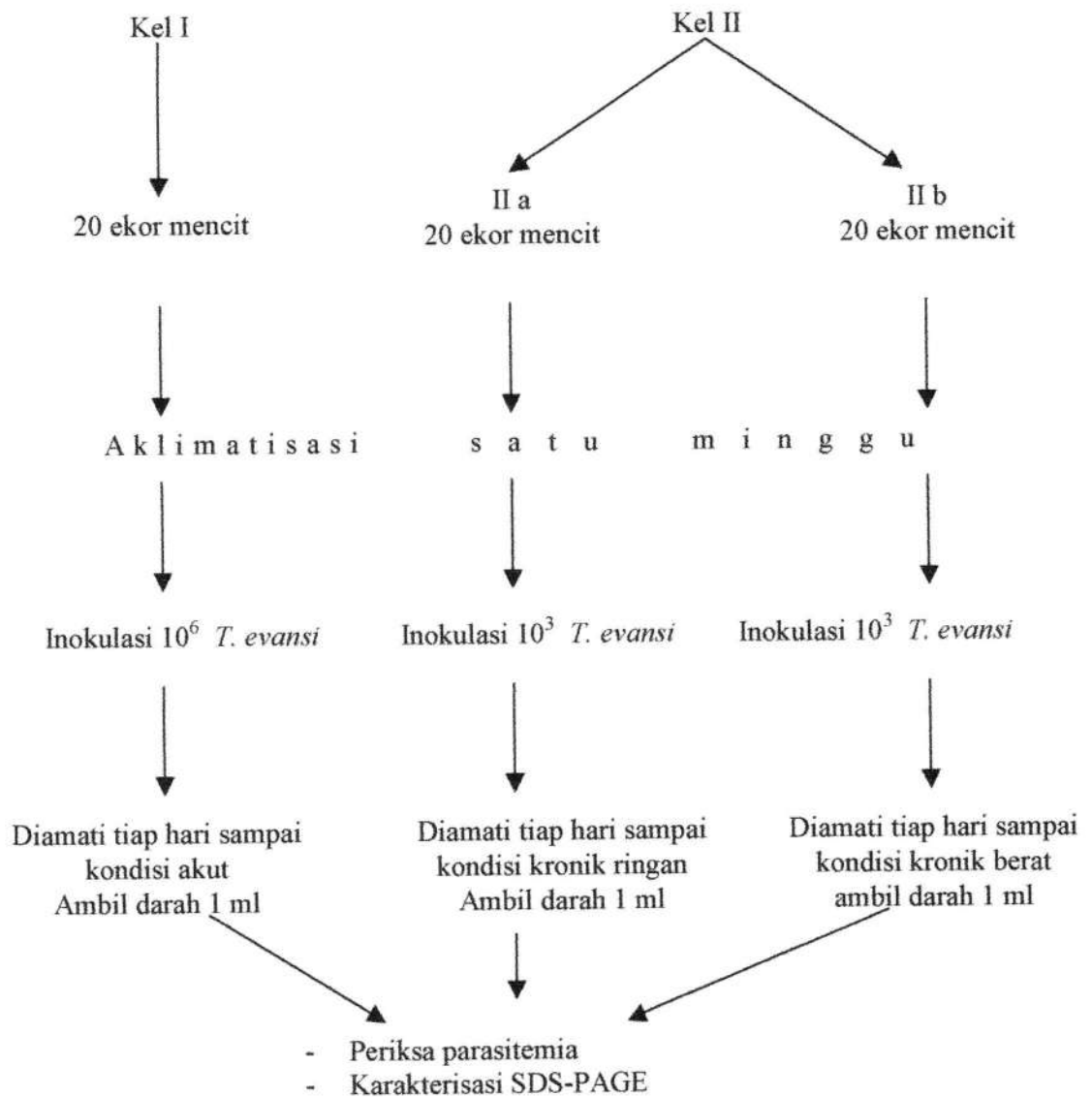
yaitu Ila sejumlah 20 ekor yang bersifat kronik ringan dan Iib sejumlah 20 ekor yang bersifat kronik berat, diadaptasikan pada kandang percobaan selama satu minggu sambil dipantau kesehatannya.

- Setelah satu minggu semua mencit pada masing-masing kelompok diinfeksi dengan isolat *T. evansi* secara intra peritoneal.
- Untuk mencit fase akut dilakukan pengambilan darah pada hari ke 5 sebanyak masing-masing 1 ml dengan cara hewan dibunuh. Sebagian darah dipakai untuk pemeriksaan parasitemia dan sisanya diproses melalui metode isolasi *T. evansi* untuk selanjutnya dikarakterisasi dengan SDS-PAGE untuk mendeteksi fraksi-fraksi protein berdasarkan berat molekulnya.
- Untuk mencit fase kronik ringan dilakukan pengambilan darah pada hari ke 35 sebanyak masing-masing 1 ml dengan cara hewan dibunuh. Sebagian darah dipakai untuk pemeriksaan parasitemia dan sisanya diproses melalui metode isolasi *T. evansi* untuk selanjutnya dikarakterisasi dengan SDS-PAGE untuk mendeteksi faktor-faktor protein berdasarkan berat molekulnya.
- Untuk mencit fase kronik berat dilakukan pengambilan darah pada hari ke 48 sebanyak masing-masing 1 ml dengan cara hewan dibunuh. Sebagian darah dipakai untuk pemeriksaan parasitemia dan sisanya diproses melalui metode isolasi *T. evansi* untuk selanjutnya

dikarakterisasi dengan SDS-PAGE untuk mendeteksi faktor-faktor protein berdasarkan berat molekulnya.

**Skema Perlakuan Pada Hewan Percobaan Adalah Sebagai**

**Berikut:**



#### 4.8 Isolasi *T. evansi*

Sejumlah  $10^6$  stabilat *T. evansi* diinokulasikan pada mencit fase akut dan sejumlah  $10^3$  stabilat *T. evansi* diinokulasikan pada mencit fase kronik. Pada hari ke lima untuk mencit fase akut, hari ke 35 untuk mencit fase kronik ringan dan hari ke 48 untuk mencit fase kronik berat dilakukan pengambilan darah 1 ml dengan cara di bunuh kemudian darah ditampung pada gelas silinder yang sebelumnya di beri anti koagulan EDTA.

Darah disentrifuge dan diambil plasmanya. Trypanosoma dipisahkan dari komponen darah menurut metode Lanham dan Godfrey (1970) yang dikutip dari Diffley dan Jayawardena (1980). Darah dipisahkan dengan menggunakan kromatografi pertukaran ion pada DEAE-selulose (DE 52, whatman).

Setelah dilakukan pencucian, maka dilakukan pemecahan seluler trypanosoma, dimana parasit diresuspensi dengan medium campuran (50 mM Tris-HCl pH. 7,4, 50 mM KCl, 5 mM MgAc<sub>2</sub>, 0,4 mM phenylmethyl sulfonil fluoride dan 1 mM Iosylchloromethylketone), kira-kira  $3 \times 10^9$  trypanosoma/ml. Kemudian dilakukan sonikasi dengan memasukkan dalam sonikator output 15/detik diulang 7 sampai 10 kali, dilakukan pada suhu 4<sup>0</sup>C dengan cara merendamkan bahan koleksi pada es. Ekstrak trypanosoma diperoleh setelah sebelumnya disentrifugasi 5000 – 7000

rpm selama 10 menit, supernatan diambil sebagai koleksi lalu disimpan pada  $-70^{\circ}\text{C}$  atau siap digunakan.

#### 4.9 SDS-PAGE

SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulphate-Polyacrylamid Gel Electrophorese) merupakan metode yang dapat digunakan untuk mendeteksi fraksi protein berdasarkan berat molekulnya, prinsip dasar dari metode ini adalah denaturasi protein oleh Sodium Dodecyl Sulphate dilanjutkan dengan separasi molekul berdasarkan berat molekulnya dengan metode elektroforesis dengan menggunakan gel, dalam hal ini yang digunakan adalah Polyacrylamid. Metode ini dapat mengikat atau mendeteksi protein dengan berdasarkan berat molekulnya tetapi tidak spesifik terhadap jenis protein tertentu. Prosedur lengkapnya adalah sebagai berikut :

Pertama kali running gel dibuat dan dimasukkan ke dalam plate kaca. Setelah mengeras pada bagian atasnya kita masukan stacking gel yang telah dipersiapkan terlebih dahulu. Running gel dan stacking gel dibuat dengan mencampurkan Acrylamid, Tris HCL, SDS 0,8%,  $\text{H}_2\text{O}$ , Temed, APS didalam beker glass. Setelah stacking gel mengeras lalu sampel yang telah direbus terlebih dahulu dapat dimasukkan. Kemudian plate kaca dimasukkan ke alat elektroforesa dicuci dengan larutan yang terdiri dari aquades, methanol, asam asetat, dan glutaraldehid. Setelah dicuci gel dapat

diwarnai dengan  $\text{AgNO}_3$  kemudian diberi larutan pengembangan warna yang terdiri Formaldehid 3,7%, Zitronsaure 5%, dan aquades. Setelah band terlihat terwarnai maka dapat distop dengan asam asetat 10 %.



## BAB 5

## HASIL PENELITIAN

## 5.1 Parasitemia

Hasil penelitian parasitemia yaitu perhitungan jumlah parasit *Trypanosoma evansi* dalam darah pada masing-masing kelompok perlakuan disajikan dalam tabel berikut ini :

Tabel 5.1. *Trypanosoma evansi* pada hari ke 5 setelah infeksi untuk fase akut, hari ke 35 setelah infeksi untuk fase kronik ringan dan hari ke 48 setelah infeksi untuk fase kronik berat.

No	Jumlah <i>T. evansi</i> ( $10^6$ )		
	Akut	Kronik ringan	Kronik berat
1	6,50	4,50	4,55
2	8,20	3,80	3,50
3	7,00	4,50	4,75
4	7,50	4,73	3,30
5	6,40	5,20	3,90
6	7,90	3,30	4,48
7	8,22	4,45	3,38
8	6,50	5,20	4,50
9	7,63	4,30	5,68
10	7,73	3,80	3,80
11	7,50	6,47	4,45
12	8,80	4,30	4,20
13	7,60	3,55	3,90
14	8,00	3,95	5,40
$\bar{X}$	7,53 <sup>a</sup>	4,43 <sup>b</sup>	4,27 <sup>b</sup>
Sd	0,69	0,78	0,68

Nilai rata-rata dan simpangan baku pada satu baris bila diikuti superskrip yang berbeda berarti berbeda nyata ( $p < 0,05$ )

Berdasarkan analisis varian perhitungan jumlah parasitemia, ternyata terdapat perbedaan yang nyata ( $\rho < 0,05$ ) diantara kelompok mencit fase akut, kronik ringan dan kronik berat setelah dilakukan isolasi T.evansi pada ketiga fase tersebut.

Sebagai uji lanjutan dengan Uji Beda Nyata Terkecil (BNT) menunjukkan bahwa jumlah trypanosoma terendah didapatkan pada isolasi dan kelompok mencit fase kronik berat pada hari ke 48 yaitu sebesar rata-rata  $4,67 \pm 0,68^b$ .

Hasil tersebut menunjukkan perbedaan yang nyata ( $\rho < 0,05$ ) dibandingkan dengan jumlah parasitemia hasil isolasi dari kelompok mencit fase akut, yaitu rata-rata sebesar  $7,53 \pm 0,69^a$ . demikian pula perbedaan nyata ( $\rho < 0,05$ ) terjadi antara kelompok mencit fase akut dibandingkan dengan kelompok mencit fase kronik ringan, yaitu rata-rata sebesar  $4,43 \pm 0,78^b$ .

Sedangkan perbandingan rata-rata jumlah parasitemia hasil isolasi antara kelompok kronik ringan dan kronik berat tidak menunjukkan perbedaan yang nyata ( $\rho < 0,05$ ).

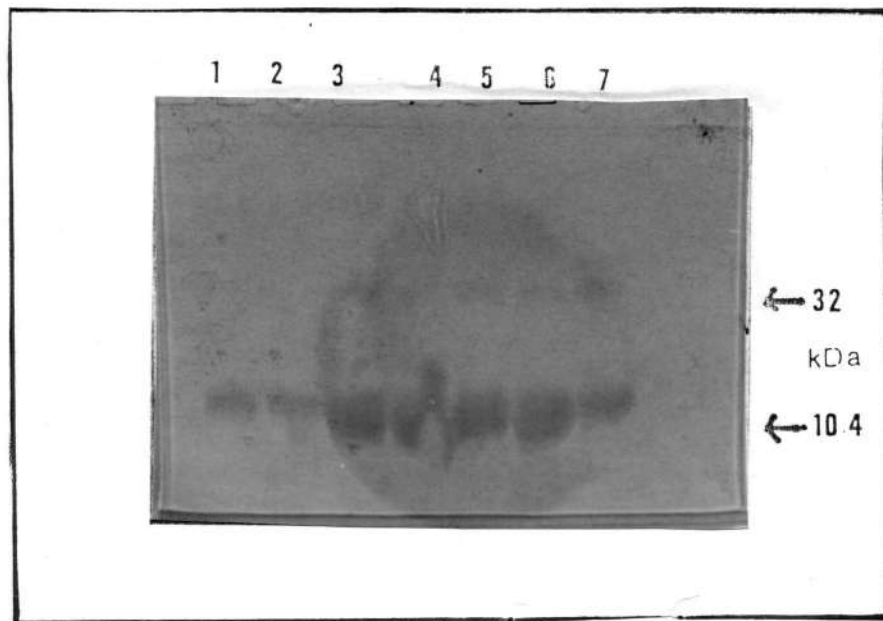
Hasil perbandingan keseluruhan diperoleh bahwa terdapat perbedaan yang nyata ( $\rho < 0,05$ ) rata-rata jumlah parasitemania antara hasil isolasi

*T. evansi* dari kelompok mencit fase akut  $7,53 \pm 0,69^a$  dengan kelompok mencit fase kronik  $4,35 \pm 0,73^b$ .

## 5.2 Berat Molekul Varian Antigenik *T. evansi*

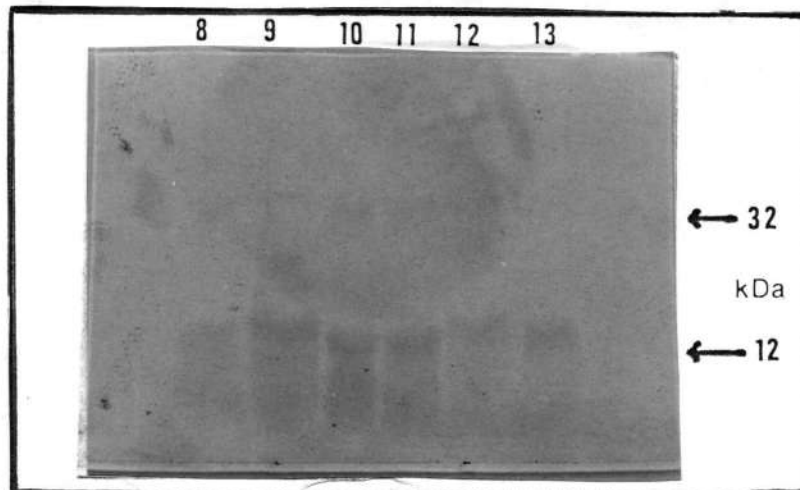
Hasil pengamatan varian antigenik *T. evansi* disajikan dalam bentuk gambar sebagai hasil penggunaan metode SDS-PAGE berupa separasi molekul berdasarkan berat molekul fraksi-fraksi protein yang tampak pada gel *Polyacrilamid* metode elektroforesis.

### 5.2.1 Varian Antigenik Pada Mencit Fase Akut



Gambar 5.1. Hasil Pengamatan Varian Antigenik *T. evansi* Isolasi dari Fase Akut dengan Metode SDS-PAGE sampel no. 1 – 7.

MILIK  
PERPUSTAKAAN  
UNIVERSITAS AIRLANGGA  
SURABAYA



Gambar 5.2. Hasil Pengamatan Varian Antigenik *T. evansi* Isolasi dari fase akut dengan metode SDS-PAGE sampel no. 8 – 13.

Keterangan : 1 – 14 merupakan nomor sampel pada kolom yang berbeda; M : Marker dan angka-angka yang menunjukkan berat molekul dengan satuan kDa.

Gambaran pita-pita pada gel elektroforesis diperoleh dari sampel trypanosoma hasil isolasi dari mencit fase akut (hari ke 5 setelah infeksi) menunjukkan fraksi-fraksi protein yang tampak berderet sesuai berat molekulnya.

Pada fase akut ini rata-rata varian antigenik ditunjukkan oleh pita-pita yang tersusun atas dua baris, yang mana masing-masing mempunyai berat molekul 10,4 kilo Dalton (kDa) dan 32 kDa.

Pada fraksi protein yang mempunyai berat molekul 10,4 kDa dimiliki oleh semua sampel trypanosoma yang diisolasi dari

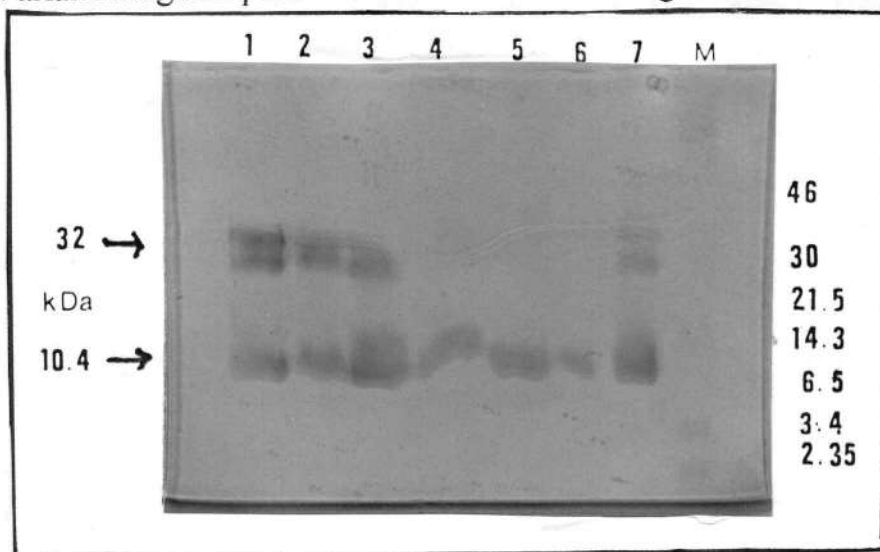
mencit fase akut, tetapi pada fraksi protein yang mempunyai berat molekul 32 kDa tidak dimiliki oleh semua sampel trypanosoma yang diisolasi dari mencit fase akut. Pada gambar 5.1. hanya sampel nomor 3 sampai dengan nomor 7 saja yang tampak fraksi protein dengan berat molekul 32 kDa dan pada gambar 5.2. hanya sampel nomor 9 sampai dengan nomor 11 saja yang menampakkan fraksi protein dengan berat molekul 32 kDa.

Sehingga dengan demikian hanya 8 sampel saja dari 13 sampel yang terdeteksi memiliki fraksi protein sebesar 32 kDa. Varian antigenik pada trypanosoma yang diisolasi dari mencit fase akut menunjukkan gambaran berat molekul protein antigenik sebesar 10,4 kDa dan 32 kDa.

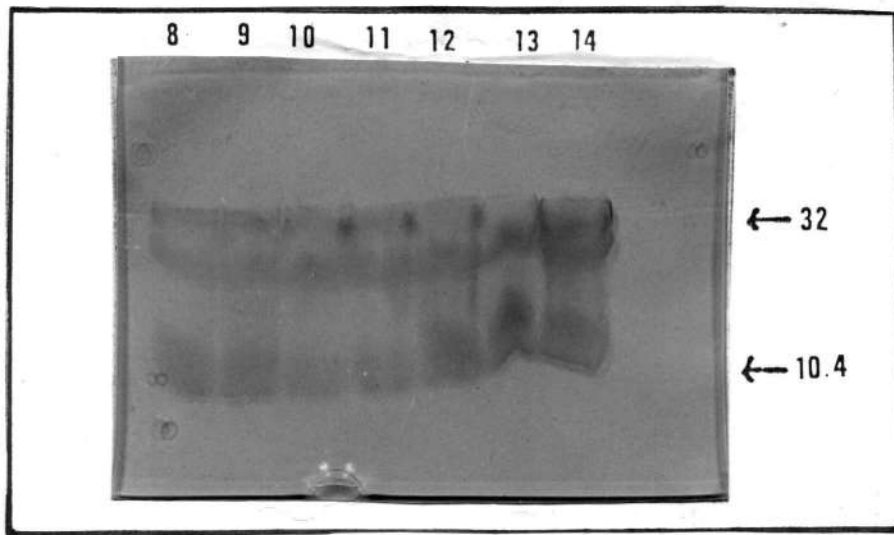
**Tabel 5.2.** Jumlah Pita-pita Protein Antigenik pada Gel Elektroforesis dari Mencit Fase Akut Trypanosomosis

No. Sampel	Berat Molekul (kDa)		
	10,4	32	50
1	+	-	-
2	+	-	-
3	+	+	-
4	+	+	-
5	+	+	-
6	+	+	-
7	+	+	-
8	+	+	-
9	+	-	-
10	+	+	-
11	+	+	-
12	+	+	-
13	+	+	-
Jumlah	13	10	0

### 5.2.2 Varian Antigenik pada Mencit Fase Kronik Ringan



**Gambar 5.3.** Hasil Pengamatan Varian Antigenik *T. evansi* Isolasi dari Fase Kronik Ringan dengan Metode SDS-PAGE sampel 1 – 7.



Gambar 5.4. Hasil Pengamatan Varian Antigenik *T. evansi* Isolasi dari Fase Kronik Ringan dengan Metode SDS-PAGE sampel 8 – 14.

Keterangan : 1 – 14 merupakan nomor sampel pada kolom yang berbeda, M : Marker dan angka-angka yang menunjukkan berat molekul dengan satuan kDa.

Hasil pemeriksaan varian antigenik *Trypanosoma evansi* yang diisolasi dari darah mencit fase kronik ringan dapat dilihat pada tabel 5.3 dan 5.4. Gambaran pita-pita antigen protein tampak dua baris yang masing-masing mempunyai berat molekul sebesar 10,4 kDa dan 32 kDa.

Pada fraksi protein dengan berat molekul 10,4 kDa ditemukan pada semua sampel trypanosoma nomor 1 – 14 yang diisolasi dari mencit fase kronik ringan (hari ke 35 setelah infeksi), tetapi pada

fraksi protein yang mempunyai berat molekul 32 kDa tidak ditunjukkan oleh semua sampel trypanosoma. Pada gambar 5.3 hanya sampel nomor 4, 5 dan 6 saja yang tidak terdeteksi fraksi proteinnya pada berat molekul 32 kDa, sedangkan pada gambar 5.4 semua sampel terdeteksi fraksi proteinnya pada berat molekul 32 kDa.

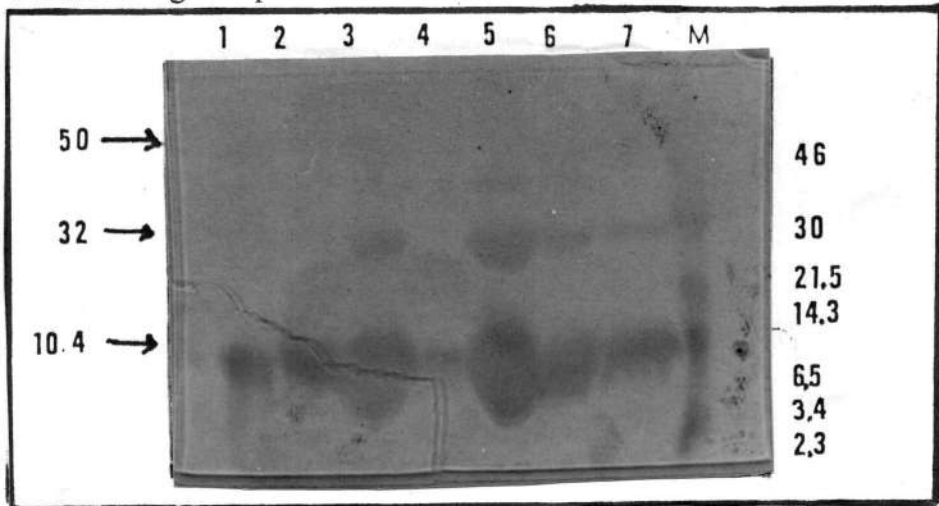
Secara keseluruhan dari 14 sampel trypanosoma evansi yang diisolasi dari darah mencit fase kronik ringan, terdeteksi sejumlah fraksi protein sebagai variasi antigenik dengan berat molekul 10,4 kDa dan 32 kDa.



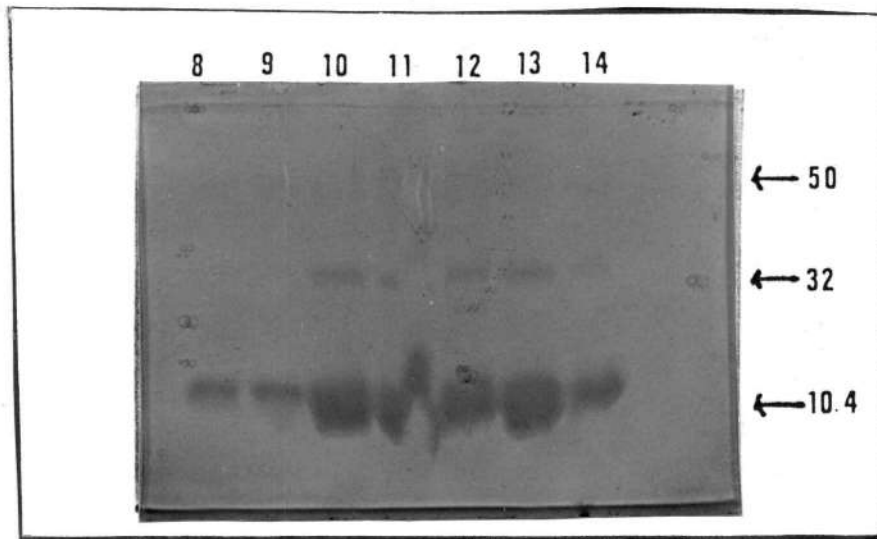
**Tabel 5.3.** Jumlah Pita-pita Protein Antigenik yang Tampak pada Gel Elektroforesis dari Mencit Fase Kronik Ringan Trypanomosis

No. Sampel	Berat Molekul (kDa)		
	10,4	32	50
1	+	+	-
2	+	+	-
3	+	+	-
4	+	-	-
5	+	-	-
6	+	-	-
7	+	+	-
8	+	+	-
9	+	+	-
10	+	+	-
11	+	+	-
12	+	+	-
13	+	+	-
14	+	+	-
Jumlah	14	11	0

### 5.2.3 Varian Antigenik pada Mencit Fase Kronik berat



**Gambar 5.5.** Hasil Pengamatan Varian Antigenik *T. evansi* Isolasi dari Fase Kronik Berat dengan Metode SDS-PAGE sampel 1 – 7.



Gambar 5.6. Hasil Pengamatan Varian Antigenik *T. evansi* Isolasi dari Fase Kronik Berat dengan Metode SDS-PAGE sampel 8 – 14.

Keterangan : 1 – 14 merupakan nomor sampel pada kolom yang berbeda, M : Marker dan angka-angka yang menunjukkan berat molekul dengan satuan kDa.

Hasil pemeriksaan varian antigenik *T. evansi* yang diisolasi dari darah mencit fase kronik ringan berat dapat dilihat pada tabel 5.5 dan 5.6. Gambaran pita-pita antigen protein tampak tiga baris yang masing-masing mempunyai berat molekul sebesar 10,4 kDa, 32 kDa dan 50 kDa.

**Tabel 5.4.** Jumlah Pita-pita Protein Antigenik yang Tampak pada Gel Elektroforesis dari Mencit fase Kronik Berat Trypanomosis

No. Sampel	Berat Molekul (kDa)		
	10,4	32	50
1	+	-	+
2	+	-	+
3	+	-	+
4	+	+	-
5	+	-	-
6	+	-	+
7	+	-	-
8	+	-	-
9	+	-	+
10	+	+	+
11	+	+	+
12	+	+	+
13	+	+	+
14	+	+	+
Jumlah	14	6	10

Pada fraksi protein dengan berat molekul 10,4 kDa ditemukan pada semua sampel trypanosoma nomor 1 – 14 yang diisolasi dari mencit fase kronik berat (hari ke 48 setelah infeksi), tetapi pada fraksi protein yang mempunyai berat molekul 32 kDa dan 50 kDa tidak ditunjukkan oleh semua sampel trypanosoma. Pada gambar 5.5 hanya sampel nomor 4 saja yang terdeteksi fraksi proteinnya pada berat molekul pada 32 kDa, sedangkan untuk fraksi protein dengan berat molekul 50 kDa, sampel nomor 4, 5 dan 7 yang tidak

terdeteksi, sedangkan sampel yang lainnya terdeteksi secara samar atau tipis pita fraksinya.

Pada gambar 5.6 hanya sampel nomor 8 dan 9 yang tidak terdeteksi fraksi proteinnya pada berat molekul 32 kDa, sedangkan untuk fraksi protein dengan berat 50 kDa, hampir semua sampel menunjukkan gambaran pita-pita fraksi protein sebagai varian antigenik secara samar atau tipis.

Jadi dengan demikian pada *T. evansi* yang diisolasi dari darah mencit fase kronik berat dapat dideteksi adanya tiga struktur varian antigenik yang berbeda berdasarkan berat molekulnya yaitu 10.4 kDa, 32 kDa dan 50 kDa. Varian antigenik ini yang membedakan dengan varian antigenik yang ditemukan pada *T. evansi* hasil isolasi dari darah mencit fase akut dan kronik ringan.

**Table 5.5.** Sebaran Sampel yang Menampakkan Pita Protein Antigenik pada Semua Fase Infeksi trypanomosis

Berat Molekul (kDa)	Fase Infeksi					
	Akut		Kronik Ringan		Kronik Berat	
	Pita Protein	No. Sampel	Pita Protein	No. Sampel	Pita Protein	No. Sampel
10,4	■	1 – 14	■	1 – 14	■	1 – 14
32	■	3 – 7, 9 – 13	■	1 – 3, 7 – 14	■	4, 10 – 14
50		-		-	■	1 – 3, 6, 9 – 14

## BAB 6

### PEMBAHASAN

#### 6.1. Deteksi Parasitemia

Sebagaimana diketahui dari hasil penelitian tentang penghitungan parasitemia dari *T. evansi* yang diisolasi dari darah mencit fase akut dan kronik menunjukkan perbedaan yang nyata. Perlu diketahui sebelumnya bahwa pada umumnya patogenitas pada trypanosomosis disebabkan oleh mekanisme imunologis, pada tubuh induk semang *T. evansi* dapat menghindarkan diri dari respon humoral dengan cara selalu mengganti sifat antigeniknya. Setiap perubahan dari antigen permukaan selalu ditandai dengan fluktuasi atau gelombang parasitemia, dimana meningkatnya jumlah parasitemia menunjukkan perkembangan suatu populasi parasit, sebaliknya hilangnya parasit dari peredaran darah perifer berarti eliminasi populasi tersebut. Dalam proses ini sistem imun tidak sekalipun mampu mengeleminasi populasi parasit secara total, sehingga trypanosoma yang tertinggal sempat berkembang, membentuk populasi baru dengan antigen permukaan yang lain dari sebelumnya. Demikian seterusnya terjadi berulang-ulang sampai pada akhirnya sistem imun induk semang tidak lagi mampu membendung populasi parasit yang sedang berkembang (Van der Ploeg *et. al.* , 1982).

Adanya perbedaan jumlah parasitemia pada mencit fase akut dan fase kronik dapat dijelaskan melalui hasil-hasil penelitian sebelumnya adalah sebagai berikut :

Authié, (1994) melakukan pengamatan parasitemia pada sapi N'Dama yang mengalami infeksi kronik dan sapi Zebu yang rentan terhadap infeksi *T. congolense*. Pada infeksi primer tidak ada perbedaan tingkat parasitemia diantara sapi N'Dama dan zebu. Bagaimanapun juga ada perbedaan secara nyata tingkat parasitemia setelah hari ke-20 sampai infeksi berlangsung. Pada sapi N'Dama yang terinfeksi kronik tampaknya mampu membatasi multiplikasi parasit dibanding sapi Zebu yang rentan. Respon antibodi lebih efisien terhadap *Variant Surface Glykoproteins* (VSGs), ini menjelaskan bahwa pada sapi yang kronik lebih efisien dalam mengontrol parasitemia. Tetapi tidak ada perbedaan diantara sapi Zebu dan N'Dama dalam hal titer antibodi dan isotipe antibodi anti VSG. Kemungkinan pada sapi yang terinfeksi kronik tidak memerankan respon anti bodi anti VSG. Kemungkinan ada mekanisme imunologi yang lain yang mungkin mempengaruhi parasitemia, misalnya : proses fagositosis, imunosupresi dan produksi sitokin yang mempengaruhi pertumbuhan parasit, seperti IFN $\gamma$  dan Tumor Necrosis Faktor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ).

Berhubungan dengan pernyataan Authié, (1994) tersebut diatas, maka Black *et al*, (2000) memberikan penjelasan tentang mekanisme imunologi lain yang mempengaruhi parasitemia pada hewan yang terinfeksi kronik. Penelitian yang dilakukan pada kerbau Cape di Afrika yang terinfeksi kronik oleh *Trypanosoma Congolense* menunjukkan bahwa tingkat parasitemia pada kerbau Cape dipengaruhi oleh mekanisme sebagai berikut :

IgG tidak memberikan reaksi dengan VSG trypanosoma, tetapi dengan materi yang terwarnai pada *flagellar pocket* trypanosoma dan dapat ditampilkan oleh adanya penyerapan glikoprotein trypanosoma yang tidak aktif yang ditandai oleh adanya *poly-N- acetyllactosamine* pada rantai samping karbonat. Molekul ini dibatasi oleh *flagellar pocket* dan sistem endosomal trypanosoma stadium metasiklik (belum membelah dan belum diselubungi VSG) dan stadium dewasa dalam darah. *Flagellar Pocket* memiliki reseptor untuk makro molekul induk semang.

Dengan demikian diketahui bahwa kemungkinan dalam hewan yang terinfeksi kronik tidak memerankan respon antibodi anti VSG saja, melainkan juga antibodi (IgG) mengadakan ikatan pada permukaan *Flagellar Pocket* melalui reseptornya, dan berperan dalam mengontrol parasitemia. Pendapat tersebut diperkuat pula oleh Umekita, (2000) yang menyatakan bahwa meskipun ada perbedaan dalam hal respon pro inflammatory antara fase akut dan

kronik, yaitu selama infeksi fase akut dideteksi adanya IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , IL-12, TGF $\beta$  dan IL10, sedangkan GM-CSF lebih dihubungkan dengan fase kronik. Tetapi respon antibodi lebih mempengaruhi mencit pada fase awal infeksi dan untuk mempertahankan rendahnya level parasitemia pada mencit yang diinfeksi fase kronik. Antibodi protektif pada fase infeksi akut tergantung dari kemampuan memicu hilangnya trypomastigot bentuk darah dari sirkulasi.

Faktor-faktor proinflammatory yang membedakan fase akut dan kronik trypanosomiasis dikemukakan oleh Antunez, (2000), bahwa pada fase akut *T. cruzi* yang menginfeksi tikus putih, pada hari kedua setelah infeksi didapatkan pada kadar sel NK dan IFN $\gamma$  yang rendah, sedangkan IL12 yang dihasilkan tinggi pada minggu kedua setelah infeksi. IFN $\gamma$  kadarnya terus meningkat selama fase akut lambat. Sedangkan pada fase kronik dapat dideteksi IL12 dan IFN $\gamma$ .

## 6.2. Varian Antigenik Pada *T. evansi*

Ada beberapa varian antigenik pada *Trypanosoma evansi* yang menginfeksi induk semang, sebagai usaha dari parasit tersebut menghindarkan diri dari respon imun humoral. Dari adanya varian antigenik tersebut, maka dapat diketahui adanya beberapa protein antigenik yang dapat diketahui melalui metode SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulphate – Poliacrilamid Gel



Elektroforese) berupa gambaran pita-pita protein yang bervariasi dan dapat dibedakan berdasarkan berat molekulnya.

Hasil karakterisasi yang dilakukan oleh Sing, et al. (1995), bahwa membran sel *T. evansi* mempunyai berat molekul 78,8 kDa (kilo Dalton) dan pada pengamatan berikutnya secara keseluruhan didapatkan pita-pita protein antigenik yang berkisar antara 25 – 98 kDa, sedangkan *flagellar antigens* sebesar 17 – 98 kDa.

Sebagaimana dari hasil penelitian dapat diketahui bahwa, makin banyak varian antigenik yang ditemukan pada *T. evansi* sejalan dengan makin berkembangnya intensitas penyakit dari akut sampai kronik. Hal tersebut sesuai dengan hasil penelitian Authié, (1994) bahwa pada sapi N'Dama yang terinfeksi kronik oleh *T. congolense* menunjukkan antigen protein sebesar 33 kDa yang memicu reaktivitas IgG1 antibodi yang berupa sistein protease yang diberi nama *Congopain* terbesar yang dapat menunjukkan adanya respon antibodi spesifik. Antibodi anti *congopain* IgM bebas tak dapat dideteksi, tetapi dapat diidentifikasi sebagai kompleks imun pada infeksi primer baik pada sapi N'Dama (kronik) maupun zebu (akut/rentan). Pada sapi N'Dama respon IgG1 *congopain* terus meningkat, terdapat korelasi positif antara rata-rata level IgG1 dengan derajat resistensi. Respon IgG1 antigen trypanosoma selain *congopain* juga didapatkan lebih tinggi pada sapi yang resisten dibanding sapi



yang rentan. Dikatakan lebih lanjut, kemungkinan perbedaan tersebut akibat disfungsi pada mekanisme *isotype switching*. Antibodi terhadap *congo-pain* ini sebagai pertanda berkembangnya intensitas infeksi kronik pada sapi N'Dama dan sapi tersebut mempunyai respon imun yang lebih efisien.

Mekanisme *isotype switching* dijelaskan oleh Rudenko (2000) bahwa, masing-masing trypanosoma mempunyai sekitar seribu gen VSG yang menyandinya. Kebanyakan gen-gen VSG ini tersusun berderet dalam kromosom posisi bagian dalam. Bagaimanapun juga gen ini terletak pada tempat ekspresi gen VSG telomerik. Tempat ekspresi ini digambarkan sebagai unit transkripsi polisistronik (penyandi gen ganda) yang mengandung tempat ekspresi gen yang berbeda-beda dalam hal gen VSG. Pergantian gen VSG yang aktif dapat melibatkan DNA membentuk gen VSG baru segera setelah tempat ekspresi VSG tidak aktif. Sebagai alternatif mereka dapat menukar gen VSG aktif oleh pergantian diantara 20 tempat ekspresi gen.

Kemungkinan pada mencit yang terinfeksi kronik baik ringan maupun berat menunjukkan adanya antigen protein 50 kDa yang tidak ditemukan pada mencit fase akut, merupakan bukti bahwa makin berkembangnya intensitas infeksi ke arah kronik, makin banyak petanda-petanda imunologis yang spesifik, khususnya menyangkut varian antigenik dari T. evansi akibat sistem proteksi parasit yang terus dikembangkan untuk mempertahankan atau

menghindarkan diri dari perangkat imun. Hal ini dapat diketahui oleh pernyataan Authié, 1994 yang menyatakan bahwa, kemungkinan ada molekul lain yang disekresikan oleh parasit trypanosoma atau jenis komponen parasit yang dikeluarkan ke dalam sirkulasi darah saat trypanosoma dipengaruhi oleh antibodi anti VSG.

Telah ditemukan adanya typanosidal dalam serum *Cape Buffalo* (Kerbau Cape) setelah terinfeksi *T. brucei*, sebagai materi protein dengan berat molekul 150 kDa. Molekul efektor yang berhasil diisolasi dengan *column chromatography* adalah *Xanthine Oxidase* (XO), yaitu molekul yang merupakan hasil oksidasi hypoxantin dan xantin dari asam urat yang melepaskan elektron  $O_2^-$ , sehingga terbentuk  $H_2O_2$  (Reduth et.al., 1994). Oksigen reaktif yang terdeteksi mempunyai aktivitas trypanosidal ini dapat dihambat oleh : 1) Allopurinol, 2) Katalase, dan 3) Peningkatan Substrat Purin dari Reaksi (Muranjan et. al., 1997).  $H_2O_2$  sebagai senyawa pembentuk XO kemungkinan terjadi di dalam lingkungan mikro dari parasit, dipercaya sebagai anti trypanosoma dan sangat kecil efeknya dalam merusak sel darah dan endotel.

Sejalan dengan adanya XO pada infeksi kronik trypanosoma pada Kerbau Cape, juga dideteksi adanya katalase dalam serum yang dapat mengurangi aktivitas trypanosidal dari XO. Aktivitas katalase serum

dipertahankan sampai 10 hari dan katalase di eritrosit dipertahankan 15 – 20 hari setelah infeksi, level katalase darah kembali normal satu bulan setelah infeksi (Wang, et. al., 1999). Katalase secara lengkap membatasi akumulasi  $H_2O_2$ , sehingga menyebabkan hilangnya atau bersihan trypanosoma secara sementara dari darah Kerbau Cape dan hal ini tidak mengeliminasi parasit dari jaringan dan tidak mempengaruhi parasitemia pada infeksi kronik Kerbau Cape (Nolan, et. al., 1999).

Sistem oksidatif trypanosidal yang ada dalam serum tidak terbatas pada Kerbau Cape saja, tetapi serum dari sapi N'Dama yang resisten terhadap *T. congolense* menunjukkan adanya poliamine oksidase yang dapat membatasi sekresi  $H_2O_2$  (Traore - Leroux, et. al., 1987).

Adanya sistein protease yang dihasilkan *T. congolense* pada sapi N'Dama yang resisten, adanya katalase yang dikeluarkan oleh *T. brucei* yang menginfeksi kerbau Cape secara kronik dan adanya pula poliamine oksidase yang dihasilkan *T. congolense* dari sapi N'Dama yang resisten untuk membatasi aktivitas trypanosidal Xantin Oksidase. Semua enzim protein tersebut merupakan protein antigenik yang dapat dipakai sebagai petanda terjadinya infeksi kronik pada hewan-hewan tersebut. Dengan demikian *T. evansi* hasil isolasi dari mencit yang diinfeksi kronik kemungkinan pula menunjukkan adanya antigen protein yang lebih banyak dibanding *T. evansi*

hasil isolasi dari mencit fase akut. Sebagaimana yang dikemukakan oleh Lonsdale, 1986, bahwa *T. evansi* mempunyai berat molekul pada protease sebesar 28 kDa dan seringkali menunjukkan aktivitas yang lebih tinggi sampai 105 kDa.

**BAB 7****KESIMPULAN DAN SARAN****7.1. KESIMPULAN**

Berdasarkan hasil penelitian tentang karakterisasi varian antigenik *Trypanosoma evansi* hasil isolasi dari mencit fase akut dan kronik, dapat ditarik kesimpulan sebagai berikut :

1. Terdapat perbedaan gambaran pita-pita protein antigenik *T. evansi* berdasarkan berat molekulnya diantara mencit fase akut, kronik ringan dan kronik berat.
2. Terdapat perbedaan bermakna ( $p < 0,05$ ) jumlah parasitemia *T. evansi* hasil isolasi dari mencit fase akut dan fase kronik.
3. Dengan adanya perbedaan gambaran pita-pita protein antigenik, dapat dipakai sebagai petanda imunologik dari intensitas penyakit (trypanosomosis).

## 7.2. SARAN

Saran yang dapat disampaikan, berdasarkan hasil penelitian yang telah diperoleh adalah sebagai berikut :

1. Gambaran parasitemia bisa lebih jelas bila dilakukan penghitungan setiap hari dari masing-masing intensitas infeksi.
2. Perlu dilakukan karakterisasi berulang-ulang untuk mendapatkan gambaran pita-pita protein yang lebih baik.
3. Perlu penelitian lebih lanjut untuk mengetahui secara spesifik varian antigenik, dengan mengujikan pada antibodi spesifik melalui metode *Western blot*.

## DAFTAR PUSTAKA

- ....., 1981. Pedoman Pengendalian Hewan Menular. Jilid I - V. Direktorat Kesehatan Hewan Jendral Peternakan DEPTAN. Jakarta. 81-82.
- ....., 1988. Laporan Penanggulangan Penyakit Surra di Jawa Timur. Dinas Peternakan Daerah Propinsi Daerah Tingkat I Jawa Timur 1-8.
- Antunez, M.I., and R.L. Cardoni. 2000. ILI2 and IFN Gamma Production, and NK Cell Activity, in Acute and Chronic Exsperimental *Trypanosoma cruzi* Infection. Immunol. Lett. 71(2) :103 - 9
- Artama, T.W. 1992. Produksi Antibodi Monoklonal Terhadap Antigen permukaan *Trypanosoma evansi*. Laporan Penelitian FKH - UGM. Yogyakarta. Hal. 3-5.
- Authié, C. 1994. Trypasomiasis and trypanotolerance in cattle : A Pole for Congapain ?. Parasitologi Today. Vol : 10. No. 9. 360-364.
- Black, S. J., E. L. Sicard, N. Murphy and D. Nolan. 2000. Innate and Acquired Control of Trypanosome Parasitemia in Cape Buffalo. Immunol and Pathol Sci. 1 - 8.
- Brochu, S., M. Olivear, and S. Rivest. 1999. Neuronal Activity and Transcription of Proinflammatory Citokines, Ikappa Balpha, and iNos in the Mouse Brain during acute endotoxemia and chronic infection with *Trypanosoma Brucei Brucei*. J. Neutosci Res. Sep. 15; 57 (6) : 801-16.
- Bronner, U.,Gustafsson,L.L.,Dona,F., Ricsson,0.,Miezan, T., Rais and L. Rombo. 1995. Pharmacokinetics and Adverse Reactions After a Single Dose of Pentamidine in Patients With *Trypanosoma gambiense* Sleeping Sickness. Br. J. Clin. Pharmacol. Mar; 39 (3). Division of Clinical Pharmacology, Karoliska Institute, Huddinge University Hospital, Sweden 289.



- De Almaida. M.L.C., M Geuskens, and E Pays, 1999. Cell Lysis Induces Redistribution of the GPI – Anchored Variant Surface Glycoprotein on Both Face or the Plasma Membran of Trypanosoma Brucei, J. cell. Sci. Dec; 112 (23) : 4461-73.
- Diffley, P., and A.H. Jayawardena. 1982. Comparative Analysis of Procedures used to isolate Variant antigen from Trypanosoma Brucei Rhodesiensi. J. Parasitol. 68 (4) : 532 – 537.
- Flynn R.J. 1973. Parasites of laboratory animals the Iowa State university Press/Ames; 3 – 4.
- Fred, O. 1997. Trypanosomes Infecting Man and Animals. Vet. Parasitol. Des 30;60 (2) : 131-142.
- Göbel, E, and Dennig, H. K. 1992. *Trypanosoma Evansi* : Beberapa Sifat Biologis dan Mikromorfologi Sebelum dan Sesudah Diberi Berenil; Higiene dan Penyakit Ternak. Editor Fischer, H., Seifert, H. S. H., Bittner, Yayasan Obor Indonesia. Jakarta. Hal 291-301.
- Ismu, DS., RC. Payne dan R. Ciraydon. 1992. Trypanosiasis R. Madura Survei Parasitologik dan Serologik Dalam Seminar Sehari Hasil Penelitian Penyakit Darah Pada Ruminansia Besar Di Indonesia. Kerjasama Balai Penelitian Pengembangan Peternakan, Bogor, 85-87.
- Jones, T.W. and C.D. Mekkinell. 1984. Antigenic Variation in Trypanosoma evansi. Isolation and Characterisation of Variable Antigen Type Population from Rabbits. Trop. Med and Parasitol 35 : 237 – 241.
- Koesdarto, S. 1998. Efektifitas Dosis Infeksi Buatan *T. evansi* (Bakit 522/terhadap Titer IgM dan IgG pada Mencit (*Mus musculus*). Media Kedokteran Hewan Unair. 14 (3): 183-185.
- Kuby J. 1994. Immunology. W. H. Freeman and Company. New York. pp. 435.
- Lanham, S.M. and P.G. Godfry. 1970. isolation of Salivarian Trypanosomes from man and other animals using DEAE-Cellulose. Exp. Parasitol. 28 : 521-534.

- Levine, 1985. *Veterinary Protozoology*. 1<sup>st</sup> Ed. Iowa State University. Ames. 19-48.
- Lonsdale, E.J.D., and G.W. Mpimbaza, 1986, Thief dependent proteases of African trypanosomes. Analysis by electrophoresis in sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gels co-polymerized with fibrinogen. *Eur. J. Biochem.* 17; 155 (3) : 469 – 73
- Losos, G. J., Ikede, B. O. 1972. Review of Pathology of Diseases in Domestic and Laboratory Animal Caused by *T. congolense*, *T. rhodensiense*, *T. vivax*, *T. brucei* *T. gambiense*. *Vet. Path.* (suppl.) 9. 1-71.
- Losos, G. J., 1985. Infections Tropical Diseases of Domestic Animal International Development Research Centre. Canada 183 – 263.
- Merrals, S. 1998. The Interaction of Microorganism with the Complement System: Parasites. *Vet. Parasitol.* Dec. 31; 80(2); 25-117.
- Morrison W. I. Max Murvey, Mc. Intyre WIM. Bovine Trypanomiasis : in Ristic M, Mc. Intyre I, Eds. *Diseases of Cattle in the Tropics*. Martinus Nijhoff publishers, London, 1981 : 464 –465.
- Muchson A. 1993. Imunisasi Berulang Pada Mencit Dengan *Trypanosoma evansi* Radiasi. Laporan Penelitian Pusat Aplikasi Isotop dan Radiasi, Batam, 277 –285.
- Muranjan, M., Q. Wang and Y.L. Li. 1997. The Trypanocidal Cape Buffalo Serum Protein is Xanthine Oxidase. *Infect. Imm.* 65; 3806 – 3814
- Ngeranwa, J.J., Gathumbi, P.K., Mutiga, E.R., and G.J. Agumbah. 1993. Pathogenesis of *Trypanosoma (brucei) evansi* in Small Animal East African Goats. *Res. Vet. Sci.* 53(3) 283.
- Nolan, D.P., M. Geuskens and E. Pays. 1999. Linear Poly – n – Acetyl – Actosamine as Sorting Signals in Exo/Endocytosis in *Trypanosoma brucei*. *Curr. Biol.* 9; 1169 – 1172

- Radswanska, M., S. Magez, A. Michel, B. Stijlemans, M. Geuskens, and E. Pays. 2000. Comparative analysis of antibody responses against HSP60, invariant surface glycoprotein 70, VSG reveals a complex antigen-specific pattern of immunoglobulin isotype switching during infection by *Trypanosoma brucei*. *Infect Immun.* Feb;68(2): 848-60.
- Ramirez, L.E., E.L. Silva, and J.M.S Junior. 1994. The Hamster (*Mesocricetus auratus*) as experimental Model in Chaga's disease : Parasitological And Hispatological Studies In Acute and Chronic Phases of *Trypanosoma cruzi* Infection *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* Jul-Sep. 27 (3) : 163 – 164.
- Reduth, D., J.G. Grootenhuis, and R.O. Olubayo. 1994. African Buffalo Serum Contains Novel Trypanosidal Protein. *J. Euk. Microbiol* : 41; 95 – 103
- Ressang, A.A. 1984. Patologi Khusus Veteriner. Dept. Urusan Res. Nas. R.I. 347-361.
- Rudenko, G. 2000. Molekular Mechanism mediating Antigenic Variation in The African Trypanosome *Trypanosome brucei*. 1 – 4. *Pub Med Link*.
- Salva, R.A., Arosemena, N.A., Herrera, H.M. Sahib, C.A., and M.S. Ferreira. 1995. Outbreak of Trypanosomiasis Due to *Trypanosoma evansi* in Horses of Pantanal Matogrossense, Brasil. *Vet. Parasitol.* Nov; 60 (1-2).167.
- Singh, V., A. Singh, and M.B. Chabra. 1995. Polypeptide profiles and antigenic characterization of cell membrane flagellar preparations of different stocks of *T. evansi*. *Vet Parasitol.* Feb;56(4): 269:76.
- Soulsby, E. J.L. 1986. Helminths, Arthropods and Protozoa of Domesticated Animal 7<sup>th</sup> Edition. Bailliere Tindall. Eastbourne. pp 516-542.
- Stevenson, P., Sones, K. R. 1995. Comparison Chloride and Homidium Bromide as Prophylactic Drug for in Cattle at Nguruman Kenya.

- Steverding, D. Y. D. stierhof, M. Chaudri, M. Ligtenberg, D. Schell, A.E. Beck-Sickinger, and P. Overath. 1994. ESAG 6 and 7 products of *Trypanosoma Brucei* form transferrin binding protein complex. *Eur J. Cell. Biol. Jun.* 64 64 (1) 78-87.
- Traore – Leroux, T., F. Fumonx, J. Chaise and G.E. Roelants. 1987. *Trypanosoma brucei* : Poliamine Oxidase – Mediated Trypanolitic Activity in The Serum of Naturrally Resistant Cattle. *Exp. Parasitol.* 64; 401 – 409
- Umekita, L.F., R.A. Leite, K.C. Barboro and I. Mota. 2000. Changes of Anti – *Trypanosoma Cruzi* Antibodies after Gamma – Irradiation of Mice in the Chronic Phase of the Infection. *Acta. Trop.* 75 (2); 211 – 7
- Uzonna, J.E., R.S. Kaushik, J.R. Gordon, and H. Tabel. 1999. Cytokines and antibody responses during *Trypanosoma congolense* infection in two bred mouse strains that differ in resistance. *Parasite Immunol.* Feb;21(2): 57-71.
- Van der Ploeg, L. T. H., D. Valerio, T. De Lange, A. Bernards. P. Borst and F. G. Grosveld. 1982. An Analysis of Cosmid Clones of Nuclear DNA from *Tripanosoma brucei* Shows That The Genes for Variant Surface Glycoproteins are Clustered in The Genome. *Nucleid Acids. Res.* 10 : 5905 – 5923.
- Wang, Q., N. Murphy and S.J. Black. 1999. Ifection – Associated Decline of Cape Buffalo Blood Catalase Augments Serum Trypaosoma Activity. *Infect. Imm.* 67; 2797 – 803
- Zitzmann, N. A. Nehlert, S. Carrone, P.M. Rudd, and M.A.J Ferguson. 2000. Protein Structure Controles the Processing of the N-Linked Oligosaccharides and Glycosylphosphatidylinositol Glycans of varian Surface Glycoproteins Expressed in Hood Stream form *Trypanosoma Brucei*. *Glycobiol.* Mar; 10 (3) : 243 – 244.

**Data Analisis Parasitemia dari Isolasi Mencit Infeksi  
Fase Akut, Kronik Ringan dan Berat**

HEADER DATA FOR: C:PARASITE LABEL: Parasitemia Akut & Kronik  
NUMBER OF CASES: 14 NUMBER OF VARIABLES: 3

	Akut	K-ringan	K-berat
1	6.50	4.50	4.55
2	8.20	3.80	3.50
3	7.00	4.50	4.75
4	7.50	4.73	3.30
5	6.40	5.20	3.90
6	7.90	3.30	4.48
7	8.22	4.35	3.38
8	6.50	5.20	4.50
9	7.63	4.30	5.68
10	7.73	3.80	3.80
11	8.80	6.47	4.45
12	7.50	4.30	4.20
13	8.00	3.55	3.90
14	7.60	3.95	5.40

----- ANALYSIS OF VARIANCE -----

HEADER DATA FOR: C:PARASITE LABEL: Parasitemia Akut & Kronik  
NUMBER OF CASES: 14 NUMBER OF VARIABLES: 3

**ONE-WAY ANOVA**

**Analisis Parasitemia dari Isolasi Mencit Infeksi  
Fase Akut, Kronik Ringan dan Berat**

GROUP	MEAN	N
1	7.534	14
2	4.425	14
3	4.271	14
GRAND MEAN	5.410	42

SOURCE	SUM OF SQUARES	D.F.	MEAN SQUARE	F RATIO	PROB.
BETWEEN	94.931	2	47.466	85.216	.000E+00
WITHIN	21.723	39	.557		
TOTAL	116.654	41			

### Uji Least Significance Difference (LSD)

$$\bar{X}_1 - \bar{X}_2 \geq \text{LSD}_{0,05}, \text{ beda signifikan}$$

$$\bar{X}_1 - \bar{X}_2 < \text{LSD}_{0,05}, \text{ beda tidak signifikan}$$

Akut dengan Kronik Ringan

$$\begin{aligned} \text{LSD}_{0,05} &= t_{0,05; 39} \sqrt{\frac{\text{MS}_E}{n_1} + \frac{\text{MS}_E}{n_2}} \\ &= 2,02 \sqrt{\frac{0,557}{14} + \frac{0,557}{14}} \\ &= 2,02 \sqrt{0,04 + 0,04} \\ &= 2,02 \times 0,28 \\ &= 0,57 \end{aligned}$$

Akut dengan Kronik Berat

$$\begin{aligned} &= 2,02 \sqrt{\frac{0,557}{14} + \frac{0,557}{14}} \\ &= 2,02 \sqrt{0,04 + 0,04} \\ &= 2,02 \times 0,28 \\ &= 0,57 \end{aligned}$$

Kronik Ringan dengan Kronik Berat

$$\begin{aligned} &= 2,02 \sqrt{\frac{0,557}{14} + \frac{0,557}{14}} \\ &= 2,02 \sqrt{0,04 + 0,04} \\ &= 2,02 \times 0,28 \\ &= 0,57 \end{aligned}$$