

**LAPORAN PENELITIAN  
HIBAH PENELITIAN TIM PASCASARJANA-HPTP  
(HIBAH PASCA)  
TAHUN II**



**PRODUKSI DAN KARAKTERISASI IMUNOGLOBULIN Y  
ANTI- *TOXOPLASMA GONDII* SEBAGAI BAHAN IMUNOPROFILAKSIS DAN  
IMUNOTERAPI TOXOPLASMOSIS KONGENITAL  
(TAHUN II)**

**Tim Peneliti:  
Lucia Tri Suwanti  
Suwarno  
Hani Plumeriastuti**

**Dibiayai oleh DIPA Universitas Airlangga sesuai dengan  
Surat Keputusan Rektor tentang Kegiatan Hibah Penelitian Tim Pascasarjana (HPTP)  
Tahun Anggaran 2012 Nomor: 2613/KR/2012, Tanggal 9 Maret 2012**

**UNIVERSITAS AIRLANGGA  
SURABAYA  
2012**

**HALAMAN PENGESAHAN**

Judul : Produksi dan Karakterisasi Immunoglobulin Y Anti-*Toxoplasma gondii* sebagai Bahan Imunoprofilaksis dan Imunoterapi Toxoplasmosis Kongenital

Peneliti Utama

a. Nama : Dr. Lucia Tri Suwanti, drh, MP.

b. Jenis Kelamin : Perempuan

c. NIP : 196208281989032001

d. Jabatan Struktural : Sekretaris Departemen Parasitologi/ Kaprodi S2 IPKMV FKH

e. Jabatan Fungsional : Lektor Kepala

f. Fakultas/Jurusan/Puslit : Kedokteran Hewan

g. Pusat Penelitian : LPPM Universitas Airlangga

h. Alamat : Kampus C Unair  
Jl. Mulyorejo Surabaya 60115

i. Telpun/fax : (031) 5992785 Fax : (031) 5993015

j. Alamat Rumah : Wisma Penjaringan sari U-27  
Jl. Pandugo Baru XIII/115 Surabaya 60297

k. Telpun/fax/email : 031-8710617, Hp: 0817310284  
[tswant@yahoo.com](mailto:tswant@yahoo.com)

**Tim Peneliti:**

No	NAMA PENELITI	BIDANG KEAHLIAN	FAKULTAS /JURUSAN	PERGURUAN TINGGI
1	Dr. Suwarno, M.Si., drh	Virologi dan Imunologi	Kedokteran Hewan	Unair
2	Dr. Hani Plumeriastuti M.Kes, drh.	Patologi Veteriner	Kedokteran Hewan	Unair

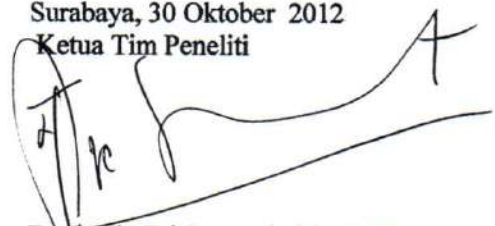
**Pendanaan dan jangka waktu**

a. Jangka Waktu Penelitian : 3 tahun

b. Biaya yang diusulkan Tahun I : Rp. 90.000.000,00

c. Biaya yang disetujui Tahun I : Rp. 60.000.000,00.

Surabaya, 30 Oktober 2012  
Ketua Tim Peneliti



Dr. Lucia Tri Suwanti, drh., M.P  
NIP: 196208281989032001



Mengetahui,  
Dekan Fakultas Kedokteran Hewan  
Prof. Hj. Romziah Sidik, Ph.D., drh  
NIP. 195312161978062001



Mengetahui  
Ketua LPPM Universitas Airlangga  
Dr. Dioko Agus Purwanto, Apt., M.Si  
NIP. 195908051987011001

## RINGKASAN

Toxoplasmosis adalah penyakit yang disebabkan oleh infeksi *Toxoplasma gondii*. Pada ibu hamil atau ternak bunting penyakit ini dapat menyebabkan kelainan kongenital berupa keguguran, mumifikasi fetus, lahir mati, lahir lemah, berat lahir ringan, hidrosefalus, korioretinitis dan kebutaan.

Tujuan umum penelitian untuk mendapatkan antibodi atau Ig Y dari kuning telur ayam sebagai bahan pengendali toxoplasmosis. Tujuan khusus pada tahun pertama untuk membuktikan bahwa antibodi terhadap *T. gondii* dapat diproduksi melalui teknologi Imunoglobulin Y dan untuk 2 tahun selanjutnya (tahun kedua dan ketiga) akan membuktikan bahwa Ig Y terhadap *Toxoplasma gondii* dapat dipergunakan untuk imunisasi pasif (imunoprolifaksis) dan seroterapi (imunoterapi) toxoplasmosis kongenital.

Penelitian dilakukan dalam 3 tahapan (tahun). Tahap 1: Produksi Antibodi anti *T. gondii* dengan teknologi Imunoglobulin Y, meliputi: Perbanyakan dan pemanenan isolat *T. gondii*, Preparasi antigen *T. gondii* dan imunisasi ayam betina siap bertelur dengan antigen *T. gondii*, isolasi dan karakterisasi IgY dari kuning telur, meliputi: Isolasi dan pemurnian antibodi, mengukur titer antibodi (ELISA). Pada tahap I telah berhasil memproduksi antibodi anti *T. gondii* dengan teknologi Imunoglobulin Y dan diperoleh dua antibodi, yaitu antibodi anti membran dan anti ES *T. gondii* Tahap 2: merupakan aplikasi antibodi antitoxoplasma sebagai imunoprolifaksis, meliputi penggantian birahi Mencit dengan PMSG dan HCG dikawinkan. Sehari sebelum diinfeksi, mencit diimunisasi dengan Ig Y secara per oral. Mencit umur kebuntingan 9,5 hari dan 14,5 hari diinfeksi dengan *T. gondii*. Empat hari setelah infeksi setengah dari jumlah mencit dikurbankan, diambil uterus dan diamati jumlah fetus, berat fetus, histopatologi plasenta dengan pengecatan HE dan pengamatan indeks apoptosis. Separa yang tetap dibiarkan hidup diamati tingkat kesakitan induk (gejala klinis), lama waktu induk bertahan hidup setelah infeksi, terjadinya abortus, jumlah anak yang dilahirkan, berat lahir anak dan angka penularan. Hasil dari tahap kedua menunjukkan imunisasi, baik dengan Ig Y anti ESA maupun anti antigen membran *T. gondii* pada mencit yang mendapatkan infeksi *T. gondii* pada umur kebuntingan 9,5 hari meningkatkan berat fetus, memperpanjang waktu timbulnya gejala klinis awal, kejadian abortus dan lama induk bertahan hidup serta menurunkan angka penularan dari induk ke fetus. Imunoglobulin Y tidak mempunyai kemampuan imunoprolifaksis melawan infeksi *T. gondii* pada mencit yang mendapatkan infeksi pada umur kebuntingan 14,5 hari. Tahap 3: Aplikasi antibodi antitoxoplasma sebagai imunoterapi mencit bunting diinfeksi dengan *T. gondii*. Mencit betina digertak birahi dengan PMSG dan HCG dan dikawinkan. Mencit bunting umur kebuntingan

9,5 hari diinfeksi dengan *T. gondii*. Mencit terinfeksi diterapi dengan Ig Y setiap hari mulai hari keenol pascainfeksi sampai melahirkan. Empat hari setelah infeksi separo mencit dikurbankan dan sisanya dibiarkan tetap hidup sampai melahirkan. Mencit yang dikurbankan, diambil uterus dan diamati jumlah fetus, berat fetus, histopatologi plasenta dengan pengecatan HE dan pengamatan indeks apoptosis. Sedang mencit yang tetap dibiarkan hidup diamati tingkat kesakitan induk (gejala klinis), lama waktu induk bertahan hidup setelah infeksi, terjadinya abortus, jumlah anak yang dilahirkan, berat lahir anak dan angka penularan

**Keyword:** imunoprolifaksis, imunoterapi, Immunoglobulin Y, *Toxoplasma gondii*.

## SUMMARY

*Toxoplasmosis* is a disease caused by *Toxoplasma gondii*. In pregnant women or pregnant cattle, disease can cause congenital abnormalities: miscarriage, fetal mummification, stillbirth, low birth, hydrocephalus, chorioretinitis and blindness.

The general objective of the study to obtain an antibody or immunoglobulin Y from chicken egg yolk as a biologic material *toxoplasmosis* control. Specific objectives in the second year to applicate the Ig Y antitoxoplasma as immunoprophylaxis in congenital *toxoplasmosis*.

The study was conducted in 3 stages (years). Stage 1: Produce antibody anti *T. gondii* through Immunoglobulin Y Technology, included: Propagation and harvesting *T. gondii*, preparation *T. gondii* antigen and immunized hens, isolation and purification IgY from egg yolk, measured antibody titers (ELISA). The results showed that antibodies against *Toxoplasma gondii* can be produced through the Immunoglobulin Y Technology and thers two tpye Ig Y, there are Ig Y anti ES antigen *T. gondii* and anti membrane antigen *T. gondii*. Phase 2: Application of antibodies antitoxoplasma as immunoprophylaxis, including: female mice are sincronized with PMSG and HCG and mated. The day before infection, mice were immunized with IgY. 9.5 days and 14.5 days gestation mice are infected with *T. gondii*. Four days after infection half of the mice are sacrificed, observed number of fetuses, fetal weight, placental histopathology with HE staining and observed apoptotic index. Half are still allowed to live and observed morbidity (clinical symptoms), the survival days after infection, the occurrence of abortion, the number of children born, the child's birth weight and transmission rate. The results showed that when immunization was did the day before infection in 9.5 days gestation infected mice, Ig Y anti *Toxoplasma gondii* can increase fetal weight, the time that clinical symptoms visible, the survival days after infection, the time that the occurrence of abortion, and Ig Y anti *Toxoplasma gondii* can reduce transmission rate, but not in 14.5 days gestation infected mice Stage 3: Application antitoxoplasma antibody as immunotherapy pregnant mice infected with *T. gondii*. Female mice are sincronized with PMSG and HCG and mated. 9.5 gestation day olds pregnant mice infected with *T. gondii*. Infected mice treated with Ig Y daily from the day after infeksi until delivery. Four days after infection mice were sacrificed and the remaining half kept alive until delivery. Mice were sacrificed, the uterus is taken and the observed number of fetuses, fetal weight, placental histopathology with HE staining and observed apoptotic index. Mice are still being kept alive the parent observed morbidity (clinical symptoms), the day survival after infection, the

**occurrence of abortion, the number of children born, birth weight children and a number of transmission**

**Keyword: immunoglobulin Y, immunoprophylaxis, immunotherapy, *Toxoplasma gondii*.**

## ABSTRAK

Toxoplasmosis adalah penyakit yang disebabkan oleh infeksi *Toxoplasma gondii*. Pada ibu hamil atau ternak bunting penyakit ini dapat menyebabkan kelainan kongenital berupa keguguran, mumifikasi fetus, lahir mati, lahir lemah, berat lahir ringan, hidrosefalus, korioretinitis dan kebutaan. Tujuan umum penelitian untuk mendapatkan antibodi atau Ig Y dari kuning telur ayam sebagai bahan pengendali toxoplasmosis. Tujuan khusus pada tahun kedua merupakan aplikasi antibodi antitoxoplasma sebagai imunoprolifaksis, meliputi penggantian birahi Mencit dengan PMSG dan HCG dikawinkan. Sehari sebelum diinfeksi, mencit diimunisasi dengan Ig Y secara per oral. Mencit umur kebuntingan 9,5 hari dan 14,5 hari diinfeksi dengan *T. gondii*. Empat hari setelah infeksi setengah dari jumlah mencit dikurbankan, diambil uterus dan diamati jumlah fetus, berat fetus, histopatologi plasenta dengan pengecatan HE dan pengamatan indeks apoptosis. Separa yang tetap dibiarkan hidup diamati tingkat kesakitan induk (gejala klinis), lama waktu induk bertahan hidup setelah infeksi, terjadinya abortus, jumlah anak yang dilahirkan, berat lahir anak dan angka penularan. Hasil dari tahap kedua menunjukkan imunisasi, baik dengan Ig Y anti ESA maupun anti antigen membran *T. gondii* pada mencit yang mendapatkan infeksi *T. gondii* pada umur kebuntingan 9,5 hari meningkatkan berat fetus, memperpanjang waktu timbulnya gejala klinis awal, kejadian abortus dan lama induk bertahan hidup serta menurunkan angka penularan dari induk ke fetus. Immunoglobulin Y tidak mempunyai kemampuan imunoprolifaksis melawan infeksi *T. gondii* pada mencit yang mendapatkan infeksi pada umur kebuntingan 14,5 hari.

### Abstract

Toxoplasmosis is a disease caused by infection with *Toxoplasma gondii*. In pregnant women or pregnant cattle, disease can cause congenital abnormalities in the form of miscarriage, fetal mummification, stillbirth, low birth, hydrocephalus, chorioretinitis and blindness. The general objective of the study to obtain an antibody or immunoglobulin Y from chicken egg yolk as a biologic material toxoplasmosis control. The objective of the study to applicate the Ig Y antitoxoplasma as immunoprophylaxis, including: female mice are sincronized with PMSG and HCG and mated. The day before infection, mice were immunized with IgY. 9.5 days and 14.5 days gestation mice are infected with *T. gondii*. Four days after infection half of the mice are sacrificed, observed number of fetuses, fetal weight, placental histopathology with HE staining and observed apoptotic index. Half are still allowed to live and observed morbidity (clinical symptoms), the survival days after infection, the occurrence of abortion, the number of children born, the child's birth weight and transmission rate. Datas were analyzed by ANOVA. The results showed that when immunization was did the day before infection in 9.5 days gestation infected mice, Ig Y anti *Toxoplasma gondii* can increase fetal weight, the time that clinical symptoms visible, the survival days after infection, the time that the occurrence of abortion, and Ig Y anti *Toxoplasma gondii* can reduce transmission rate, but not in 14.5 days gestation infected mice

**Keyword:** immunoglobulin Y, immunoprophylaxis, immunotherapy, *Toxoplasma gondii*.

## CAPAIAN INDIKATOR KINERJA

Tahun	Luaran yang direncanakan	Realisasi/Capaian
Pertama	1. Temuan baru berupa bahan Immunoglobulin (Ig) Y anti- <i>Toxoplasma gondii</i>	1. Dihasilkan 2 macam Ig Y yaitu Ig Y anti antigen ES dan anti antigen membran
	2. Tesis	2. Dua Mahasiswa S2 IPKMV yang terlibat penelitian telah lulus pada bulan Maret 2012 dan Juni 2012.
	3. Publikasi	3. Publikasi pada Seminar Internasional (3 Judul), bulan Juni 2012
Kedua	1. Ig Y anti antigen ES dan anti antigen membran dapat sebagai imunoprolifaksis	1. Pada infeksi dini Ig Y anti-ESA dan anti-antigen membran memberikan perlindungan terhadap infeksi <i>T.gondii</i>
	2. Tesis	2. Dua Mahasiswa S2 IPKMV yang terlibat penelitian telah mendaftar ujian proposal tesis,



## KATA PENGANTAR

Penelitian dengan judul :” **Produksi dan Karakterisasi Imunoglobulin Y Anti-*Toxoplasma gondii* sebagai Bahan Imunoproliferasi dan Imunoterapi Toxoplasmosis Kongenital (Tahap II)**”, telah kami laksanakan dan telah memberikan hasil sebagai mana kami sajikan dalam laporan ini. Puji syukur kami haturkan ke Hadirat Yang Kuasa, karena kami yakin keberhasilan ini tidak lepas campur tanganNya.

Kami juga tidak menutup mata, bahwa penelitian ini dapat berhasil karena jasa berbagai pihak, maka pada kesempatan ini kami juga mengucapkan banyak terima kasih kepada

1. Prof. Dr. H. Fasich, Apt selaku Rektor Universitas Airlangga Surabaya
2. Dr. Djoko Agus Purwanto, Apt. M.Si. selaku Ketua Lembaga Penelitian Universitas Airlangga Surabaya yang telah mengikutkan seleksi dan Usulan Penelitian Fundamental kami sehingga mendapatkan dana.
3. Prof. Hj . Romziah Sidik, Ph.D, drh selaku Dekan Fakultas Kedokteran Hewan yang memberikan rekomendasi Usulan Penelitian Fundamental kami sehingga memenuhi persyaratan untuk mendapatkan dana.
4. Tim Reviewer yang telah dengan ketelitian menilai dan menyeleksi semua usulan penelitian yang masuk serta melakukan monitoring dan menilai kelayakan hasil penelitian.
5. Drh Dwi Priowidodo MSc yang telah memberi isolat *Toxoplasma gondii*.

Kami berharap hasil penelitian ini dapat bermanfaat bagi penanggulangan toxoplasmosis baik pada manusia maupun hewan. Kami sadar akan keterbatasan kami, maka demi kesempurnaan hasil dan penyajian laporan ini, kami menampung saran yang konstruktif.

Penulis

ix

## DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN PENGESAHAN .....	ii
RINGKASAN .....	iii
SUMMARY .....	v
ABSTRAK .....	vii
CAPAIAN INDIKATOR KINERJA .....	viii
KATA PENGANTAR .....	ix
DAFTAR ISI .....	x
DAFTAR TABEL.....	xi
DAFTAR GAMBAR .....	xii
BAB I PENDAHULUAN .....	1
BAB II TINJAUAN PUSTAKA .....	3
BAB III TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN .....	12
BAB IV METODE PENELITIAN .....	13
BAB V HASIL DAN PEMBAHASAN.....	17
BAB VI KESIMPULAN DAN SARAN .....	37
BAB VII RENCANA/PENELITIAN TAHAP SELANJUTNYA .....	38
DAFTAR PUSTAKA .....	40
LAMPIRAN .....	42

## DAFTAR TABEL

Tabel 1. Rata-rata dan Simpangan Baku Jumlah Fetus Mencit pada Induk yang Mendapatkan Infeksi <i>T. gondii</i> pada Umur Kebuntingan 9,5 hari .....	18
Tabel 2. Rata-rata dan Simpangan Baku Berat Fetus Mencit dari Induk yang Mendapatkan Infeksi <i>T. gondii</i> pada Umur Kebuntingan 9,5 hari .....	19
Tabel 3. Rata-rata dan Simpangan Baku Skor Kerusakan Plasenta Mencit Setelah Diinfeksi <i>T. gondii</i> pada Umur Kebuntingan 9,5 hari .....	21
Tabel 4. Rata-rata dan Simpangan Baku Indeks Apoptosis Trofoblas Mencit Setelah Diinfeksi <i>T. gondii</i> pada Umur Kebuntingan 9,5 hari .....	24
Tabel 5. Rata-rata dan Simpangan Baku Lama Waktu Mencit Menunjukkan Gejala Klinis Setelah Diinfeksi <i>T. gondii</i> pada Umur Kebuntingan 9,5 hari .....	25
Tabel 6. Rata-rata dan Simpangan Baku Lama Waktu Induk bertahan Hidup Setelah Infeksi <i>T. gondii</i> pada Umur Kebuntingan 9,5 Hari .....	26
Tabel 7. Rata-rata dan Simpangan Baku Waktu Kejadian Abortus Setelah Mencit diinfeksi <i>T. gondii</i> pada Umur Kebuntingan 9,5 Hari.....	27
Tabel 8. Rata-rata dan Simpangan Angka Penularan dari Induk yang Diinfeksi <i>T. gondii</i> pada umur Kebuntingan 9,5 Hari ke Fetus.....	29
Tabel 9. Rata-rata dan Simpangan Baku Jumlah Fetus Mencit Empat Hari Setelah Infeksi pada Umur Kebuntingan 14,5 hari .....	30
Tabel 10. Rata-rata dan Simpangan Baku Berat Fetus Fetus Mencit Empat Hari Setelah Infeksi pada Umur Kebuntingan 14,5 Hari .....	31
Tabel 11. Rata-rata dan Simpangan Baku Skor Kerusakan Plasenta Mencit Setelah Diinfeksi <i>T. gondii</i> pada Umur Kebuntingan 14,5 hari .....	32
Tabel 12. Rata-rata dan Simpangan Baku Indeks Apoptosis Trofoblas Mencit Setelah Diinfeksi <i>T. gondii</i> pada Umur Kebuntingan 14,5 hari .....	33
Tabel 13. Rata-rata dan Simpangan Baku Lama Waktu Mencit Menunjukkan Gejala Klinis Setelah Infeksi <i>T. gondii</i> pada Umur Kebuntingan 14,5 Hari .....	33
Tabel 14. Rata-rata dan Simpangan Lama Waktu Induk Bertahan Hidup Setelah Infeksi <i>T. gondii</i> pada Umur Kebuntingan 14,5 Hari .....	34
Tabel 15. Rata-rata dan Simpangan Baku Jumlah Anak yang Dilahirkan pada Mencit yang Diinfeksi pada Umur Kebuntingan 14,5 Hari .....	35
Tabel 16. Rata-rata dan Simpangan Berat Lahir Anak Mencit yang Dilahirkan Mencit yang Diinfeksi pada Umur Kebuntingan 14,5 Hari .....	36
Tabel 17. Rata-rata dan Simpangan Angka Penularan dari Induk yang Diinfeksi <i>T. gondii</i> pada umur kebuntingan 14,5 hari ke Fetus .....	36

**DAFTAR GAMBAR**

**Gambar 1. *Vaginal Plug* Mencit Betina Setelah Kawin. .... 17**

**Gambar 2. Fetus Mencit Mencit Umur 13,5 hari..... 20**

**Gambar 3. Histopatologi Plasenta Mencit 4 hari setelah Infeksi *T. gondii* ..... 22**

**Gambar 4. Apoptosis Trofoblas Mencit 4 hari setelah Infeksi *T. gondii* ..... 23**

**Gambar 5. Anak mencit yang dilahirkan dari induk mencit terinfeksi *T. gondii*..... 35**

## BAB I PENDAHULUAN

MILIK  
PERPUSTAKAAN  
UNIVERSITAS AIRLANGGA  
SURABAYA

### 1. Latar Belakang

Toxoplasmosis adalah penyakit yang diakibatkan oleh infeksi *Toxoplasma gondii*. Penyakit ini bersifat zoonotik dan pada umumnya asimtomatis. Pada ibu hamil dan hewan betina bunting dapat mendatangkan resiko yang serius yaitu kegagalan reproduksi dan kelainan kongenital, berupa resorpsi fetus, mumifikasi fetus, abortus, lahir mati, lahir lemah dan penularan pada fetus (Weissmann, 2003). Hal ini diperkuat oleh hasil-hasil penelitian pengusul, yang menunjukkan bahwa berat fetus mencit mengalami penurunan pada induk yang diinfeksi *T. gondii* (Suwanti, 2009). Pada perkembangan embrio ayam, infeksi *T. gondii* kongenital ini sudah berpengaruh sejak embrio berumur hari hari. Pada embrio ayam umur satu hari terjadi penurunan jumlah somite, pada embri umur tiga hari ukuran menurun sangat signifikan dan pada hari ketujuh, embrio sudah mati (Suwanti, 2010). Kelainan akibat infeksi kongenital ini kemungkinan berhubungan dengan perubahan baik seluler maupun molekuler dalam plasenta. Hal ini dikaitkan dengan hasil penelitian yang menunjukkan bahwa pada mencit bunting yang infeksi menunjukkan peningkatan apoptosis trofoblas dan peningkatan apoptosis ini tergantung dari umur kebuntingan saat mendapatkan infeksi (Suwanti, 2006<sup>a</sup>), terjadinya apoptosis trofobalas berhubungan dengan peningkatan ekspresi FAS di trofoblas (Suwanti dkk, 2006). Infeksi *T. gondii* pada saat kebuntingan juga meningkatkan aktifitas Limfosit dan makrofag di desidua dari placenta yang ditandai dengan peningkatan IFN- $\gamma$  dan TNF- $\alpha$  (Suwanti, 2006<sup>b</sup> dan Suwanti, 2008), di mana kedua sitokin tersebut bersifat embriotoksik (Raghupathy, 2001).

Selama ini, pencegahan toksoplasmosis kongenital dilakukan hanya dengan menghindari kontak dengan sumber penularan dalam hal ini kotoran kucing dan menghindari makan daging kurang masak dari hewan yang terinfeksi. Program vaksinasi belum sepenuhnya memberikan perlindungan. Vaksin hidup yang dilemahkan dari galur S48 telah dikembangkan. Meskipun dalam uji tantangan vaksin tersebut dinyatakan aman dan memberikan perlindungan, tetapi belum dapat digunakan, karena masih ada peluang untuk menyebabkan infeksi. Usaha untuk memproduksi vaksin baik untuk manusia maupun hewan terus diusahakan dan difokuskan untuk merangsang perlindungan imunitas tanpa menimbulkan efek infeksi kronis. Beberapa hasil yang diperoleh dari pengembangan vaksin *Toxoplasma* sampai sekarang dirasa belum memuaskan. Sebagai bahan vaksin, kebanyakan

percobaan dilakukan dengan menggunakan protein P30 (SAG1), GRA1, GRA7, dan ROP2, tetapi hasil vaksinasi dengan protein tersebut menunjukkan efisiensi vaksin masih sangat terbatas. Sebagai contoh, vaksinasi dengan SAG1 secara intra nasal hanya menurunkan jumlah penyebaran kista di otak tetapi tidak menghilangkan kista tersebut (Velge-Roussel *et al.*, 2000). Vaksinasi dengan Vaksin DNA GRA1, GRA7, dan ROP2 hanya memberikan perlindungan partial (Vercammen *et al.*, 2000), dan hasil tersebut hanya ditunjukkan pada mencit galur C3H, sedang vaksinasi pada mencit BALB/c dan C57BL/6 tidak memberikan perlindungan.

Sedangkan efektifitas pengobatan dari berbagai penelitian memberikan hasil yang tidak sama (Rev. Wallon *et al.*, 1999). Bersumber dari penelitian mulai tahun 1966-1995 diperoleh hasil dua versi yang kontradiktif. Pertama, pengobatan efektif menurunkan penularan dari ibu ke anak dan kedua, pengobatan tidak efektif. Menurut Sciammarella (2001), pengobatan prenatal masih mempunyai peluang terjadi penularan kongenital sebesar 25%. Dari data tersebut dapat diartikan bahwa pengobatan masih perlu dievaluasi.

Pemanfaatan antibodi untuk pengendalian (pencegahan melalui imunisasi pasif dan pengobatan atau imunoterapi) terhadap penyakit sudah banyak dikaji. Untuk tujuan ini kebanyakan produksi antibodi yang diinginkan melalui teknologi antibodi monoklonal atau poliklonal dari mamalia. Mamalia yang sering dipilih untuk memproduksi antibodi (baik poliklonal maupun monoklonal) antara lain mencit dan kelinci. Kerugian penggunaan mamalia sebagai sumber antibodi yaitu hewan menjadi stres pada saat dilakukan imunisasi dan pengambilan darah serta hewan harus dikurbankan untuk mengambil lien sebagai sumber limfosit B, sel yang memproduksi antibodi.

Untuk mengatasi kerugian ini maka diajukan alternatif pembuatan antibodi melalui kuning telur. Menurut hasil rangkuman dari Michael *et al* (2010), produksi antibodi dari telur ayam yang diimunisasi merupakan *excellent* alternatif terhadap serum dari mamalia. Penggunaan antibodi dari ayam (Ig Y) mempunyai keuntungan dibanding antibodi dari mamalia, diantaranya Ig Y tidak bereaksi dengan *rheumatoid factors*, Ig G mamalia dan Reseptor Fc bakteri. Ig Y juga tidak mengaktifkan komplemen mamalia.

*T. gondii* adalah protozoa intraseluler obligat, seperti patogen intraseluler lainnya, *T. gondii* membangkitkan respons imun, baik imun seluler maupun humoral (Ghaffar, 2001; Johnson, 1990). Produksi dan karakterisasi antibodi anti *T. gondii* pada mamalia sudah banyak dilakukan, termasuk yang kami lakukan pada tahun 1996. Namun demikian, sampai saat ini produksi antibodi terhadap *T. gondii* melalui teknologi imunoglobulin Y belum pernah dilakukan.

Hasil tahun pertama menunjukkan bahwa antibodi terhadap *Toxoplasma gondii* dapat diproduksi melalui teknologi Imunoglobulin Y dan dihasilkan 2 jenis antibodi yaitu Ig Y anti antigen ES *T. gondii* dan Ig Y anti antigen membran *T. gondii*. Apakah antibodi yang dihasilkan memberikan perlindungan terhadap infeksi *T. gondii* perlu dibuktikan melalui penelitian ini.

## BAB II

### TINJAUAN PUSTAKA

#### 2.1 Infeksi *Toxoplasma gondii*

##### 2.1.1 *Toxoplasma gondii*

*Toxoplasma gondii* merupakan parasit protozoa intraseluler obligat yang dapat menginfeksi semua mamalia dan semua bangsa burung. Menurut Jonson (1990), *T. gondii* merupakan satu-satunya spesies yang patogen dari genus *Toxoplasma* dan menurut Levine (1985), *T. gondii* diklasifikasikan ke dalam filum Apicomplexa, kelas Sporozoasida, Subkelas Coccidiasina, Ordo Eucoccidiorida, Subordo Eimeriorina dan Famili Sarcocystidae.

Penyakit akibat infeksi *T. gondii* disebut toxoplasmosis, bersifat zoonotik dan pada umumnya asimtomatis. Menurut Wyler (1990) infeksi pada manusia, toxoplasmosis akan menimbulkan masalah klinis yang serius pada dua keadaan, yaitu: pada penderita kelainan imunitas, seperti AIDS, dan pada wanita hamil. Pada penderita AIDS toxoplasmosis dapat menyebabkan encephalitis fatal, sedangkan apabila menginfeksi wanita hamil, dapat mendatangkan resiko yang serius terhadap bayi dalam kandungan berupa abortus dan kelainan kongenital. Pada hewan betina, infeksi *T. gondii*, menyebabkan kegagalan reproduksi, berupa resorpsi fetus, mumifikasi fetus, abortus, lahir mati, lahir lemah dan penularan pada fetus (Buxton 1998; rev. Dubey *et al.*, 1998; Weissmann, 2003).

##### 2.1.2 Morfologi dan siklus hidup *Toxoplasma gondii*

Siklus hidup *T gondii* baru dapat dijelaskan dengan lengkap pada tahun 1970 meskipun parasit ini telah dikenal sejak 1908. Dalam siklus hidupnya dikenal tiga stadium *T. gondii*: takizoit, bradizoit (kista jaringan), dan sporozoit (ookista). Pada saat infeksi akut, takizoit menginvasi dan berproliferasi dalam sel. Takizoit menginvasi semua tipe sel. Pada infeksi kronis, bradizoit berada pada kista jaringan. Sporozoit terdapat dalam ookista yang sudah berspora. Ookista merupakan stadium hasil perkembangan seksual yang terjadi di epitel usus kucing dan keluar bersama feses kucing terinfeksi.

Kucing merupakan induk semang utama sedangkan hewan lain dan manusia sebagai induk semang antara. Induk semang terinfeksi karena menelan stadium kista dalam daging hewan terinfeksi atau ookista yang keluar bersama feses kucing. (Dubey *at al.*, 1998; Frenkel, 1990) Pada kucing, *T. gondii* mengalami siklus perkembangan di intrainestinal dan ekstraintestinal. Perkembangan di intrainestinal seperti perkembangan koksidia lain. Ookista atau kista yang tertelan masuk ke dalam usus. Di dalam usus halus kucing, kista atau ookista



*T. gondii* mengalami eksistasi membebaskan bradizoit/sporozoit. Bradizoit dalam kista jaringan ataupun sporozoit dalam ookista akan terbebas dengan aksi peristaltik usus dan enzim pencernaan. Bradizoit ataupun sporozoit akan menembus sel epitel usus dan berproliferasi secara aseksual (skizogoni) menghasilkan skizon yang berisi merozoit-merozoit. Merozoit tipe D dan E berubah menjadi gametosit, makrogamet dan mikrogamet. Fertilisasi makrogamet oleh mikrogamet menghasilkan zigot yang disebut ookista. Ookista selanjutnya dilepas ke dalam lumen usus dan keluar bersama feses kucing. Periode prepaten (mulai parasit masuk ke dalam tubuh induk semang sampai ookista keluar) tergantung dari stadium yang menginfeksi kucing. Apabila yang ditelan ookista atau takizoit, ookista akan keluar bersama feses 21-40 hari setelah penelanan dan apabila yang ditelan kista jaringan dalam jumlah banyak ookista akan dihasikan 3-6 hari setelah infeksi. Di luar tubuh induk semang, ookista bersporulasi menjadi bentuk infeksi. Gambaran ookista infeksi adalah dalam satu ookista berisi dua sporokista dan tiap sporokista berisi empat sporozoit. (Dubey *et al.*, 1998; Frenkel 1990; Gaffar, 2001; Johnson, 1990)

Di dalam usus kucing, bradizoit ataupun sporozoit juga menembus mukosa usus halus, ditangkap oleh makrofag dan meneruskan perkembangan di ekstraintestinal. Bersama aliran darah dan cairan limfe, *Toxoplasma* menyebar ke berbagai jaringan dan menginfeksi berbagai sel berinti kecuali eritrosit. Parasit mencapai berbagai organ 24 sampai 48 jam setelah infeksi (Dubey *et al.*, 1998). Pola perkembangan ekstraintestinal selain terjadi dalam kucing juga terjadi pada induk semang antara.

Takizoit merupakan stadium proliferasi. Pada stadium ini parasit berkembang sangat cepat dan biasanya terjadi pada saat penyakit berjalan akut dan mampu menembus semua tipe sel. Pada keadaan akut, ditandai dengan penyebaran dan pertumbuhan takizoit di intraseluler berbagai organ induk semang (Channon *et al.*, 2000).

Respons imun induk semang akan memicu perubahan bentuk takizoit menjadi bradizoit. Bradizoit secara lambat membelah dan berakumulasi dalam jumlah banyak membentuk suatu kista. Kista dapat ditemukan pada berbagai jaringan terutama di otak dan otot. Dalam sel induk semang, takizoit dan bradizoit berada dalam vakuola parasitofora. Perkembangbiakan kedua stadium tersebut terjadi secara endodiogeni. Bradizoit merupakan stadium istirahat. Pada stadium ini parasit tahan terhadap enzim pencernaan.

### 2.1.3. Respons imun terhadap infeksi *T. gondii*

Infeksi *T. gondii* dapat membangkitkan respons imun induk semang terinfeksi baik secara humoral maupun seluler (Ghaffar, 2001; Johnson, 1990). Respons imun humoral

ditunjukkan dengan pembentukan beberapa kelas antibodi spesifik dalam serum. Pada infeksi akut, baik pada manusia dan mamalia lain, ditandai dengan peningkatan secara signifikan antibodi IgA dan IgM spesifik melawan komponen antigenik mayor P30 atau SGA1 (Joss, 1995 dalam Dupouy-Camet, 2002) dan pada fase infeksi kronis dicirikan dengan IgG spesifik.

*T. gondii* merupakan parasit intraseluler obligat, seperti patogen intraseluler lainnya, *T. gondii* membangkitkan respons imun seluler lebih dominan dibanding respons humoral (Denkers dan Gazzinelli, 1998; Johnson, 1990). Kemampuan *T. gondii* membangkitkan respons imun seluler dicirikan dengan respons yang kuat ke arah Th1 yang menghasilkan IFN- $\gamma$ . Pada infeksi *T. gondii*, IFN- $\gamma$  tidak hanya dihasilkan oleh Th1 saja tetapi juga oleh sel NK dan sel T sitolitik (sel T CD8+).

#### 2.1.4. Infeksi *T. gondii* pada saat kebuntingan

Secara umum infeksi *T. gondii* bersifat asimtomatis, tetapi apabila menginfeksi wanita hamil atau ternak bunting akan mengakibatkan resorpsi fetus, abortus, lahir mati, kematian bayi dan kelainan kongenital berupa retardasi mental, kelainan mata ringan sampai buta dan hidrosefalus (Dubey *et al.*, 1998; Dupouy-Camet, 2002, Ghaffar, 2001). Kelainan kongenital terjadi karena toxoplasmosis dapat menular secara transplasental.

Infeksi pada wanita hamil, angka penularan toxoplasmosis secara transplasental dan resiko kerusakan fetus berhubungan langsung dengan umur kehamilan pada waktu mendapatkan infeksi. Infeksi pada umur kehamilan trimester pertama, angka penularan 17% dengan resiko abortus spontan, infeksi trimester kedua angka penularan 25% dengan resiko abortus spontan atau fetus terinfeksi berat dan infeksi pada kehamilan trimester ketiga angka penularannya 65% dengan resiko fetus terinfeksi ringan. (*Pediatric Database*, 1994)

Pada domba, infeksi *T. gondii* sering mengakibatkan kegagalan reproduksi. Tingkat kejadian patologis tergantung pada umur kebuntingan saat mendapatkan infeksi (Weissmann, 2003) dan ciri karakteristik dari toxoplasmosis kongenital pada domba antara lain: resorpsi fetus, mumifikasi fetus, abortus, lahir mati dan lahir lemah (Buxton, 1998). Menurut Spronk (2000), infeksi *T. gondii* pada trimester pertama menyebabkan kematian dan resorpsi fetus domba, infeksi pada setengah umur kebuntingan menyebabkan fetus terinfeksi dan diabortuskan, sedangkan infeksi pada trimester ketiga menyebabkan abortus, lahir mati, mumifikasi fetus atau lahir lemah.

### 2.1.5 Diagnosa toxoplasmosis

Penentuan diagnosis toxoplasmosis sulit dilakukan. Pemeriksaan serologis merupakan cara yang paling sering digunakan. Pada manusia, umumnya diagnosa toxoplasmosis akut didasarkan pada deteksi antibodi dan jarang yang didasarkan pada diketemukannya parasit di cairan, jaringan dan sekresi tubuh. Keberadaan kadar tinggi dari IgG spesifik terhadap *Toxoplasma* menunjukkan bahwa infeksi telah terjadi dan tidak dapat membedakan antara infeksi perolehan yang terjadi saat ini atau infeksi sudah lewat. Titer antibodi IgM spesifik terhadap *Toxoplasma* yang tinggi dan titer IgG yang tinggi menunjukkan infeksi telah terjadi akut 3 bulan sebelumnya, titer IgM rendah sampai sedang dan IgG tinggi menunjukkan infeksi akut telah berjalan 3-6 bulan sebelumnya dan IgM masih terdeteksi sampai 18 bulan setelah terinfeksi. Penentuan waktu kejadian infeksi pada wanita hamil sangat diperlukan karena infeksi pada saat sebelum terjadi konsepsi tidak menimbulkan resiko penularan pada fetus dan hanya infeksi setelah konsepsi yang menimbulkan resiko. (Hughes, 2000).

Terdapat berbagai teknik pemeriksaan serologis, yang secara prinsipial merupakan reaksi antara antigen dan antibodi. Antibodi dalam serum penderita direaksikan dengan antigen *Toxoplasma*. Beberapa teknik pemeriksaan yang dapat digunakan antara lain: uji hemaglutinasi tidak langsung (*Indirect haemagglutination/IHA*), uji aglutinasi langsung (*Direct Agglutination/DA*), *Immunosorbent Agglutination Assay (ISAGA)*, uji antibodi fluorescen tidak langsung (*Indirect Fluorescent Antibody/IFA*), uji Sabin Felman (*Dye Test/DT*), *Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)* dan uji fiksasi komplemen (*complement fixation/CF*). Uji IHA, ISAGA dan DA sering menunjukkan hasil negatif pada toxoplasmosis kongenital dan hanya akurat untuk diagnosis pada infeksi akut (Desmont *et al.*, 1994; Wilson *et al.*, 1990). Uji IFA sering memberikan hasil positif palsu dan nilai diagnostik tergantung pada ketersediaan antiserum spesifik (Belanti, 1993). Uji DT sudah mulai ditinggalkan orang karena pada uji DT menggunakan *T. gondii* hidup sebagai antigen, sehingga membahayakan bagi teknisi yang mengerjakan. Sementara, uji CF saat ini sudah jarang digunakan karena hasil uji CF sangat bervariasi dan sangat tergantung pada preparasi antigen dan sensitivitas teknik ini sangat rendah (Wilson *et al.*, 1990).

Dengan pemeriksaan serologis dapat pula dideteksi keberadaan antigen dalam serum. Hal ini telah dibuktikan oleh Araujo *et al.* (1980), yang menggunakan antibodi monoklonal spesifik untuk mendiagnosa toxoplasmosis dari serum dan cairan tubuh penderita. Antibodi monoklonal merupakan pelacak yang kuat untuk mengidentifikasi immunodominan spesifik pada agen penyakit infeksi serta dapat dipergunakan sebagai alat pendeteksi antigen dalam serum.

Diagnosis prenatal telah dikembangkan dengan teknik PCR (Hohlfeld *et al.*, 1994). Darah janin dan cairan ketuban dipergunakan untuk sampel pemeriksaan. Dengan diagnosa dini ini diharapkan resiko toxoplasmosis kongenital dapat ditekan.

Diagnosa penyebab abortus domba karena *T. gondii* didasarkan pada lesi histologis plasenta (Weissmann, 2003). Mineralisasi kotiledon merupakan ciri karakteristik abortus karena *T. gondii*. Plasenta pucat dan abu-abu keunguan, kotiledon rapuh (*friable*) dan pucat kekuningan, dengan tekstur yang kasar. Secara mikroskopis terlihat nekrosis. Pada stadium akut, organisme terlihat pada perifer foki nekrotik (Buxton, 1998). Apabila dengan pengecatan hematoxylin dan eosin tidak terlihat, pengecatan imunohistokimia jaringan plasenta juga dianjurkan untuk mendeteksi keberadaan antigen *T. gondii* (Ugla *et al.*, 1987; Weissmann, 2003).

Kusus pada kucing dang bangsa felidae, diagnosa juga dapat dilakukan berdasarkan pemeriksaan feses. Dalam feses kucing penderita akan diketemukan stadium ookista.

#### 2.1.6 Pencegahan toxoplasmosis

Pencegahan yang dapat dilakukan hanya dengan menghindari kontak dengan sumber penularan dalam hal ini kotoran kucing dan daging yang terinfeksi. Lingkungan harus bersih sehingga terindar dari kontaminasi ookista yang keluar bersama kotoran kucing. Daging harus dimasak dengan matang, sayuran dan buah harus dicuci bersih sebelum dimakan. Wanita hamil harus menggunakan sarung tangan sewaktu kontak dengan tanah (berkebun) dan menghindari kontak dengan kucing liar. Lokasi peternakan harus dihindarkan dari kucing liar. Pemerintah dan industri daging harus terus berusaha mengurangi kemungkinan keberadaan *Toxoplasma* dalam daging. (Hughes, 2000; Weissmann, 2003)

Program vaksinasi belum dapat dilakukan. Vaksin hidup yang dilemahkan dari galur S48 telah dikembangkan. Meskipun dalam uji tantangan vaksin tersebut dinyatakan aman dan memberikan perlindungan, tetapi belum dapat digunakan. (Buxton, 1992 dalam Weissmann, 2003)

Usaha untuk memproduksi vaksin baik untuk manusia maupun hewan terus diusahakan dan difokuskan untuk merangsang perlindungan imunitas tanpa menimbulkan efek infeksi kronis. Beberapa hasil yang diperoleh dari pengembangan vaksin *Toxoplasma* sampai sekarang dirasa belum memuaskan. Sebagai bahan vaksin, kebanyakan percobaan dilakukan dengan menggunakan protein P30 (SAG1), GRA1, GRA7, dan ROP2, tetapi hasil vaksinasi dengan protein tersebut menunjukkan efisiensi vaksin masih sangat terbatas. Sebagai contoh, vaksinasi dengan SAG1 secara intra nasal hanya menurunkan jumlah penyebaran kista di

otak tetapi tidak menghilangkan kista tersebut (Velge-Roussel *et al.*, 2000). Vaksinasi dengan Vaksin DNA GRA1, GRA7, dan ROP2 hanya memberikan perlindungan partial (Vercammen *et al.*, 2000), dan hasil tersebut hanya ditunjukkan pada mencit galur C3H, sedang vaksinasi pada mencit BALB/c dan C57BL/6 tidak memberikan perlindungan.

### 2.1.7 Pengobatan toxoplasmosis

Bervariasi hasil pengobatan toxoplasmosis pada saat kebuntingan. Hasil *review* Wallon *et al.* (1999) dari hasil berbagai penelitian mulai tahun 1966-1997 yang pernah dipublikasi di berbagai media mengenai pengobatan toxoplasmosis pada wanita hamil menunjukkan bahwa tidak sepenuhnya pengobatan efektif. Dari sembilan (9) subyek yang memenuhi kriteria, lima (5) penelitian membuktikan bahwa obat efektif menurunkan penularan dari ibu ke anak dan empat (4) penelitian memberikan bukti bahwa pengobatan tidak efektif. Dari data tersebut disimpulkan bahwa pengobatan masih perlu dievaluasi.

Beberapa obat yang dianjurkan antara lain: Spiramycin, kombinasi Pyrimethamine dan Sulfadiazine, kombinasi Clindamycin dan Pyrimethamine. Pengobatan menggunakan Spiramycin dan Sulfonamid diperuntukkan untuk menurunkan angka transmisi dari ibu ke anak dan mengurangi keparahan infeksi pada fetus (Desmots dan Couveur, 1974 dalam Wallon *et al.*, 1999).

Pyrimethamine (Daraprim) merupakan antagonis dari asam folat yang dapat menghambat enzim dihydrofolate reductase. Sulfadiazine (microsulfon), kerjanya sebagai antagonis kompetitif terhadap PABA, sehubungan dengan pertumbuhan organisme. lindamycin (Cleocin) dikombinasi dengan pyrimethamine biasa digunakan pada CNS toxoplasmosis pada pasien AIDS. (Sciammarella, 2001)

## 2.2. Imunoglobulin Y

Imunoglobuli Y pertama kali diperkenalkan oleh Klemperer pada tahun 1893. ditunjukkan bahwa apabila ayam diimunisasi menghasilkan antibodi spesifik dalam serum yang kemudian ditransfer ke kuning telur. Tetapi, penemuan Klemper ini tidak segera diaplikasikan, baru pada tahun 1980an di mana isu *animal welfare* menjadi perhatian para pecinta binatang, maka para ilmuwan mulai menaruh perhatian dan mengembangkan teknik ini.

Dalam pemahaman *animal welfare*, penggunaan ayam petelur untuk produksi antibodi untuk mengurangi penderitaan dan jumlah hewan coba. Rasa sakit akibat pengumpulan serum

ataupun pengurbanan hewan coba dapat dihindari. Jumlah hewan coba dapat dikurangi karena produksi antibodi dengan menggunakan ayam petelur bisa mencapai 18 kali dibanding dengan pembuatan antibodi menggunakan kelinci. Hal ini karena antibodi dalam kuning telur konsentrasinya lebih tinggi, lebih dari 100 mg antibodi dalam satu telur. Sehingga apabila dalam satu bulan ayam bisa bertelur 20 butir maka akan diperoleh 2 g antibodi dalam satu bulan. (Chalghoumi *et al.*, 2009)

Pada burung, dikenal tiga kelas imunoglobulin, yaitu: IgA, IgM dan Ig Y. Ig A dan Ig M sama dengan Ig A dan Ig M pada mamalia. Sedangkan Ig Y berada dalam serum dan kuning telur unggas secara fungsional sama dengan Ig G dari mamalia, tetapi ditinjau dari struktur Ig G dan Ig Y berbeda. Ig Y dalam serum mencapai 75% dari total imunoglobulin. Konsentrasi dari masing-masing imunoglobulin dalam serum adalah: Ig Y 5,0 mg/ml, Ig A 125 mg/ml sedangkan Ig M 0,61 mg/ml. Maternal Ig A dan Ig M ditransfer dalam putih telur sedangkan Ig Y dalam serum induk ayam ditransfer ke kuning telur. Konsentrasi Ig A dalam putih telur 0,7 mg/ml dan konsentrasi Ig M dalam putih telur 0,15 mg/ml, sedangkan Ig Y dalam kuning telur 8-25 mg/ml. (Michael *et al.*, 2010)

### 2.2.1. Produksi IgY

Imunoglobulin Y dapat diproduksi dengan cara mengimunisasi induk ayam dengan antigen yang diinginkan. Faktor-faktor yang mempengaruhi keberhasilan produksi antibodi Y, antara lain: antigen (meliputi dosis dan berat molekul antigen), jenis adjuvan yang digunakan, bagaimana cara pemberian vaksin, frekuensi vaksinasi dan interval waktu vaksinasi awal dengan pengulangannya.

### 2.2.2. Pemanfaatan IgY untuk Imunisasi Pasif

Imunisasi pasif adalah pemberian antibodi dari individu satu ke individu penerima dengan tujuan penerima mendapatkan penguatan terhadap suatu penyakit. Penguatan pasif ini dapat terjadi secara alami, ketika antibodi maternal ditransfer ke anak dalam kandungan. Imunisasi pasif secara ini juga dapat dilakukan dengan cara memberikan antibodi dari individu yang telah diimunisasi atau individu yang baru sembuh dari suatu penyakit ke individu non-imun. Imunisasi pasif bisa diberikan melalui intravena atau per oral. Pemanfaatan Ig Y untuk imunisasi pasif telah banyak diteliti untuk pencegahan dan pengobatan penyakit infeksius terutama penyakit saluran pencernaan. Dari hasil rangkuman Chalghoumi *et al.*, (2009), Ig Y dapat diberikan dalam bentuk: serbuk telur, serbuk kuning telur, serbuk fraksi yang dapat terlarut air atau Ig Y yang murni.

### **BAB III**

## **TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN**

### **Tujuan Penelitian**

#### **Tujuan Umum**

Tujuan umum penelitian ini untuk mendapatkan antibodi atau Ig Y dari kuning telur ayam sebagai bahan pengendali toxoplasmosis.

#### **Tujuan Khusus:**

- a. Untuk membuktikan bahwa antibodi terhadap *Toxoplasma gondii* dapat diproduksi melalui teknologi Imunoglobulin Y
- b. Untuk membuktikan bahwa Ig Y terhadap *Toxoplasma gondii* dapat dipergunakan untuk imunisasi pasif pencegahan toxoplasmosis kongenital.

#### **Manfaat Penelitian**

Hasil penelitian diharapkan memberikan manfaat bagi perkembangan ilmu, peningkatan kualitas lulusan, ketepatan lama studi mahasiswa dan pencegahan infeksi toxoplasmosis kongenital.



## BAB IV

### METODE PENELITIAN

Penelitian dilakukan dalam 3 tahapan (tahun), dan yang akan dilaporkan pada paper ini penelitian tahap ke dua merupakan aplikasi antibodi hasil produksi tahun pertama sebagai imunoprolifaksis. Pada tahun pertama dihasilkan 2 Ig Y anti toxoplasma yaitu, anti membran dan dan anti ESA.

Aplikasi antibodi antitoxoplasma sebagai imunoprolifaksis, meliputi imunisasi dengan IgY pada mencit bunting sebelum mendapat infeksi *T. gondii*. Mencit betina imun digertak birahi dengan PMSG dan HCG untuk mendapatkan umur kebuntingan yang sama dan segera dikawinkan. Mencit umur 9,5 hari dan 14,5 hari diinfeksi dengan *T. gondii*. Empat hari setelah infeksi setengah dari jumlah mencit dikurbankan, diambil uterus dan diamati jumlah fetus, berat fetus, histopatologi plasenta dengan pengecatan HE dan pengamatan indeks apoptosis. Separa yang tetap dibiarkan hidup diamati tingkat kesakitan induk (gejala klinis), lama waktu induk bertahan hidup setelah infeksi, terjadinya abortus, jumlah anak yang dilahirkan, berat lahir anak, jumlah anak yang mati dan angka penularan.

#### 4.1. Kultivasi *T gondii* secara *in vivo*

Isolat *T. gondii* yang dipergunakan galur RH yang disimpan di Laboratorium Protozoologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga Surabaya. Isolat diperbanyak dengan cara dipasasekan ke mencit (Suwanti, 2005). Mencit diinjeksi secara intraperitoneal. Dosis injeksi  $10^3$  takizoit tiap mencit. Empat hari atau setelah mencit menunjukkan gejala mencit lemah dan bulu berdiri, mencit dikurbankan dan diambil cairan peritoneal. Ke dalam cavum peritoneum mencit ditambahkan 5 ml NaCl fisiologis dan cairan diambil kembali. Parasit dalam cairan peritoneal dihitung dengan hemositometer untuk selanjutnya dilakukan pembuatan antigen.

#### 4.2. Isolasi dan Pemurnian Imunoglobulin Y dari kuning telur ayam imun

##### 4.2.1. Isolasi Antibodi Anti-Toxoplasma dari Kuning Telur

Antibodi berada dalam kuning telur. Menurut Michael *et al* (2010), kombinasi kloroform dan presipitasi dengan amonium sulfat merupakan metode pilihan yang menghasilkan antibodi dengan tingkat kemurnian yang tinggi. Sebanyak 0,5 ml kuning telur ditambah 0,5 ml Buffer Saline pH 7,2 dan ditambah dengan 2 ml kloroform. Suspensi diinkubasi selama 30 menit pada suhu ruang dengan sesekali dikocok. Selanjutnya dilakukan



sentrifugasi pada 3000 rpm selama 15 menit. Supernatan diambil dan disimpan dalam suhu -20° C atau siap untuk digunakan sebagai sampel.

#### 4.2.2. Pemurnian Antibodi

Pemurnian antibodi anti-Toxoplasma dilakukan dengan cara presipitasi menggunakan amonium sulfat jenuh (Ko and Ahn, 2007), kemudian dilakukan pemurnian dengan dialisis. Fraksi protein Toxoplasma yang telah diendapkan dengan amonium sulfat dimasukkan ke dalam kantong selopon, selanjutnya kantong tersebut dimasukkan dalam PBS 0,5 M dan diputar dengan *magnetic stirrer* selama 24 jam dalam suhu 4° C

#### 4.3. Imunisasi mencit dengan immunoglobulin Y anti- *T. gondii*.

Seratus enam puluh ekor mencit betina umur 2 bulan digertak birahi dengan PMSG dan HCG lalu dikawinkan untuk mendapatkan umur kebuntingan yang sama (Suwanti, 2005). Delapan puluh ekor mencit bunting dibagi menjadi 4 kelompok. Setiap kelompok terdiri 20 ekor mencit bunting. Kelompok kontrol negatif (P0) tidak diimunisasi dan tidak diinfeksi dan kelompok kontrol positif (P1) diinfeksi dan tidak dimunisasi, kelompok perlakuan (P2) mencit diimunisasi Ig Y anti ESA dan diinfeksi dengan *T. gondii* dan kelompok perlakuan (P3) mencit diimunisasi Ig Y anti Antigen membran dan diinfeksi dengan *T. gondii*. Imunisasi dilakukan sehari sebelum diinfeksi. Dosis imunisasi tiap antibodi dengan 75 µg IgY secara oral. Satu hari setelah imunisasi mencit perlakuan (P2 dan P3) dibagi dua: sepuluh ekor mencit diinfeksi pada umur kebuntingan 9,5 hari dan sepuluh ekor lainnya diinfeksi pada umur kebuntingan 14,5 hari. Infeksi *T. gondii* secara intra peritoneal dengan dosis infeksi 10 takizoit tiap ekor mencit. Empat hari setelah infeksi, 5 ekor mencit dari tiap kelompok dikurbankan dan diambil uterus serta diamati jumlah fetus, berat fetus, histopatologi plasenta dengan pengecatan HE dan pengamatan indeks apoptosis. Lima ekor yang tetap dibiarkan hidup diamati tingkat kesakitan induk (gejala klinis), lama waktu induk bertahan hidup setelah infeksi, terjadinya abortus, jumlah anak yang dilahirkan, berat lahir anak dan angka penularan.

#### 4.4. Penentuan Indeks Apoptosis Trofoblas dengan TUNEL ASSAY

Metode seperti yang dilakukan (Suwanti, 2005) dengan menggunakan *Apoptotic kit Apop tag* (Daco). Sayatan plasenta setebal 4-5 µm dalam *embedding* paraffin, dideparafinisasi dengan Xylene 3 kali, ethanol absolut 2 kali, ethanol 95% 1 kali, ethanol 70% 1 kali, dan terakhir dengan PBS. Jaringan ditetesi proteinase K selama 15 menit, lalu

dicuci 2 kali dengan dH<sub>2</sub>O. Untuk menghilangkan *endogenous peroxidase*, jaringan ditetesi 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> PBS selama 5 menit pada suhu kamar, lalu dicuci 2 kali dengan PBS masing-masing 2 menit. Jaringan diinkubasikan dalam buffer yang berisi digoxigenin yang dilabel deoxy-UTP dan terminal deoxynucleotidyl transferase pada suhu 37°C di tempat yang lembab selama 1 jam. Sampel lalu dicuci 3 kali dengan PBS, kemudian ditambahkan konjugat peroksidase anti-digoxigenin dan diinkubasikan dalam suhu ruangan selama 30 menit. Selanjutnya slide dicuci 4 kali dengan PBS, kemudian ditambah diaminobenzidine dan diinkubasikan selama 5 menit. Cuci tiga kali dengan PBS dan ditambahkan *counterstain methyl green* (Sigma), kemudian dicuci 3 kali dengan dH<sub>2</sub>O. Preparat selanjutnya dikeringkan dan ditutup dengan *cover glass*,

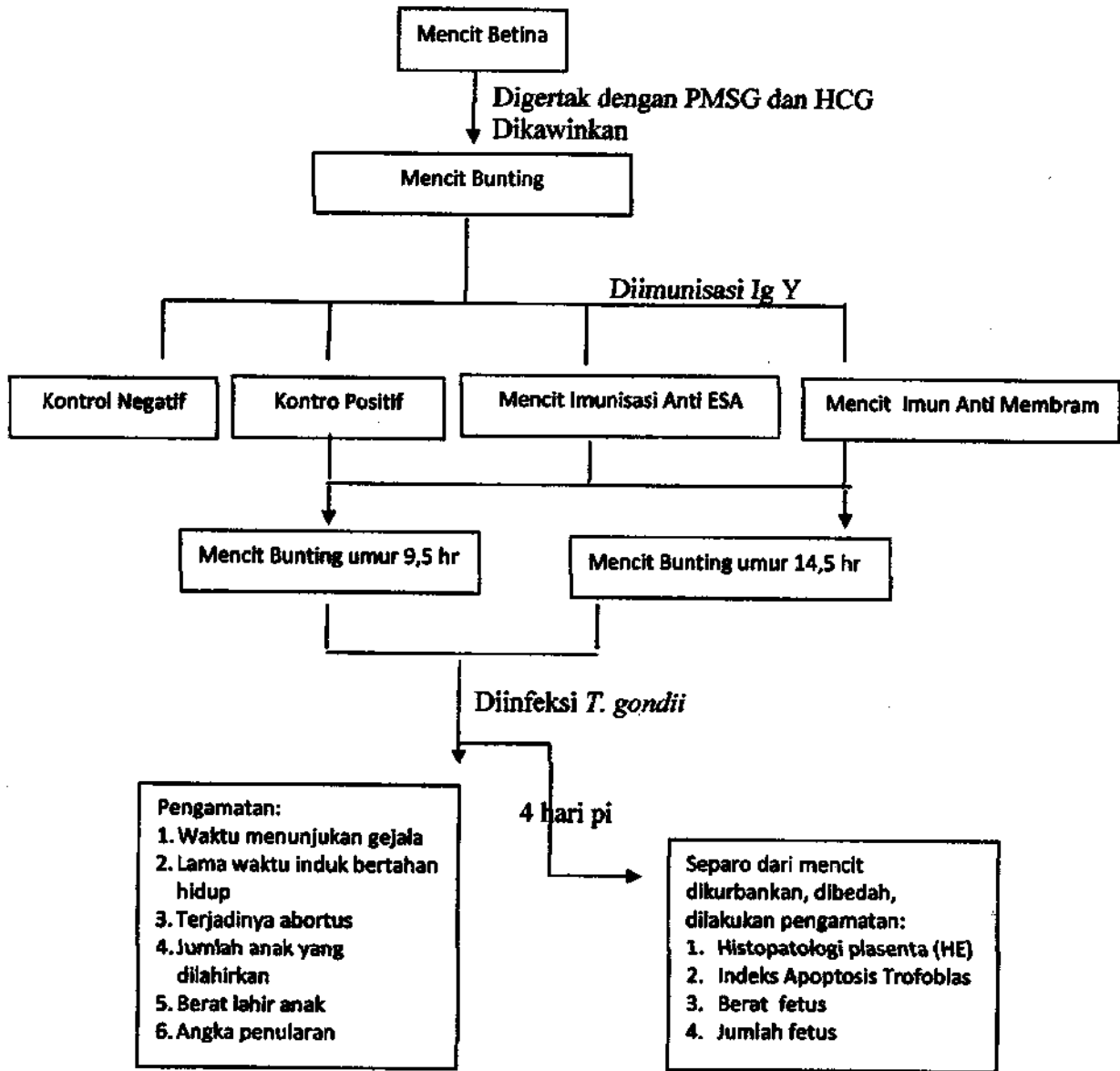
#### **4.5. Penentuan Angka Penularan Kongenital**

Pengamatan angka penularan pada fetus dan anak mencit dilakukan dengan uji biologis. Jaringan anak mencit yang berhasil dilahirkan disuntikan ke mencit yang sehat. Anak mencit dinyatakan tertular apabila dalam cairan pertoneal mencit yang diinokulasi jaringan ditemukan takizoit.

#### **4.6. Analisis Data**

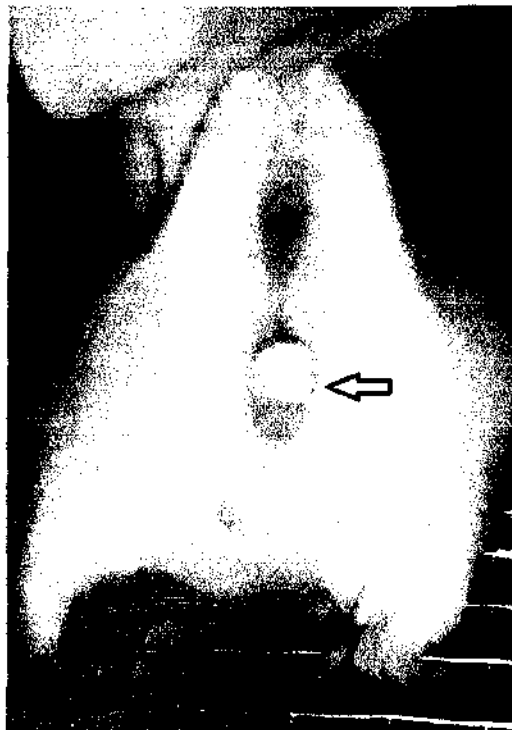
Data tingkat kesakitan (gejala klinis) disajikan secara diskriptif. Jumlah induk mencit yang mati dan yang bertahan hidup, adanya abortus, berat dan jumlah fetus yang berhasil dilahirkan, penularan pada fetus (jumlah ferus yang tertular) dan indeks apoptosis diuji dengan ANOVA.

#### **4.7. Sistematika Penelitian tahap 2**



**BAB V****HASIL DAN PEMBAHASAN****5.1 Hasil imunisasi dengan Ig Y pada mencit yang diinfeksi *T. gondii* pada umur kebuntingan 9,5 hari**

Mencit dinyatakan bunting apabila pada keesokan hari setelah perkawinan ditemukan vaginal plaque pada vagina mencit betina. Umur kebuntingan ditentukan, apabila ditemukan vaginal plaque, dinyatakan bahwa umur kebuntingan mencit 0,5 hari (Suwanti, 2005). Jadi umur kebuntingan 9,5 hari dihitung 9 hari setelah ditemukan *vaginal plug*.



Gambar 1. *Vaginal Plug* Mencit Betina Setelah Kawin.

**5.1.1. Jumlah dan Berat Fetus**

Jumlah dan Berat Fetus mencit dari lima ekor mencit yang dikurbankan empat hari setelah infeksi dari tiap kelompok tergambar pada tabel 1 dan tabel 2. Mencit diinfeksi pada

umur kebuntingan 9,5 hari, jadi pada saat dikurbankan, kebuntingan mencit berumur 13,5 hari.

Dari Tabel 1 terlihat bahwa Jumlah Fetus dari setiap perlakuan tidak berbeda nyata artinya jumlah fetus tidak terpengaruh oleh perlakuan. Meskipun terjadi resorpsi atau ukuran fetus yang mengecil pada kelompok kontrol positif (Lihat Gambar 2), tetapi masih terlihat sehingga masih dihitung sebagai fetus, sehingga tidak mengurangi jumlah dari fetus.

**Tabel 1. Rata-rata dan Simpangan Baku Jumlah Fetus Mencit dari Induk yang Mendapatkan Infeksi *T. gondii* pada Umur Kebuntingan 9,5 hari**

Perlakuan	Rata-rata dan Simpangan Baku
Kontrol Negatif	18 ± 6 <sup>a</sup>
Kontrol Positif	13 ± 3 <sup>a</sup>
Mencit Yang dimunisasi Ig Y anti ESA	13 ± 9 <sup>a</sup>
Mencit Yang dimunisasi Ig Y anti Antigen Membran	16 ± 6 <sup>a</sup>

Keterangan: notasi yang sama menunjukkan tidak ada perbedaan ( $p > 0,05$ )

Perlakuan mempengaruhi berat fetus, hal ini tercermin dari Tabel 2. Berat Fetus pada mencit kontrol positif (mencit yang diinfeksi dan tidak diimunisasi) menunjukkan yang paling ringan dan kelompok mencit yang mendapatkan imunisasi Ig Y baik Ig Y anti ESA maupun anti antigen membran *T. gondii* tidak berbeda nyata dengan kelompok kontrol negatif (yang tidak diinfeksi). Hal ini berarti imunisasi Ig Y melindungi terhadap penurunan berat fetus yang diakibatkan oleh infeksi *T. gondii*. Kelompok mencit yang diinfeksi dan tidak dimunisasi berat fetusnya sangat berbeda nyata dengan kelompok kontrol, Hasil ini hasil penelitian sebelumnya yang mengatakan bahwa infeksi *T. gondii* menurunkan berat fetus (Suwanti, 2009), meskipun umur kebuntingan saat mendapatkan infeksi berbeda. Bahkan ukuran fetus dari 3 induk mencit kontrol positif mengecil (Lihat Gambar 2). Satu ekor induk

mencit pada kelompok mencit yang mendapat imunisasi Ig Y anti-ESA, fetusnya satu mengecil.

**Tabel 2. Rata-rata dan Simpangan Baku Berat Fetus Mencit dari Induk yang Mendapatkan Infeksi *T. gondii* pada Umur Kebuntingan 9,5 hari**

Perlakuan	Rata-rata dan Simpangan Baku (dalam gram)
Kontrol Negatif	0,394 ± 0,062 <sup>a</sup>
Kontrol Positif	0,200 ± 0,054 <sup>b</sup>
Mencit Yang dimunisasi Ig Y anti ESA	0,304 ± 0,082 <sup>a</sup>
Mencit Yang dimunisasi Ig Y anti Antigen Membran	0,352 ± 0,058 <sup>a</sup>

Keterangan: notasi yang berbeda menunjukkan ada perbedaan yang nyata ( $p < 0,05$ )



Gambar 2. Fetus Mencit Mencit Umur 13,5 hari (4 hari setelah infeksi pada umur kebuntingan 9,5 hari).

### 5.1.2. Histopatologi Plasenta

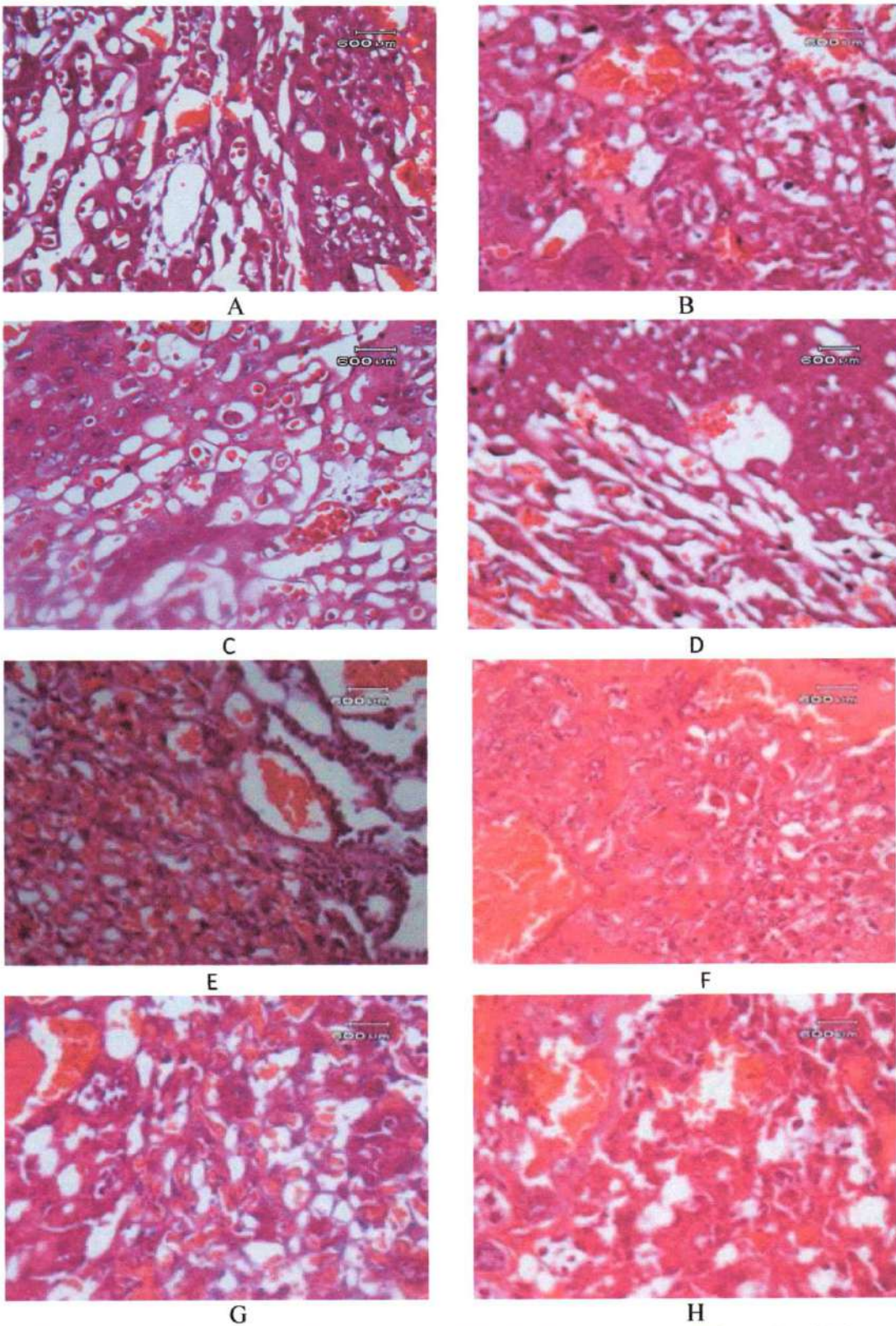
Data histopatologi plasenta ditampilkan dengan skor kerusakan plasenta. Skor dihitung berdasarkan adanya peradangan, edema dan kongesti pada slide potongan plasenta dan tiap slide diamati dari 5 pandang secara acak. Hasil perhitungan statistik dapat dilihat pada tabel 3. Gambaran histopatologi dari tiap perlakuan dapat dilihat pada gambar 3. Pada kelompok kontrol positif tingkat kerusakan plasenta paling tinggi, hal ini menunjukkan pengaruh infeksi menyebabkan kerusakan dari plasenta. Penelitian sebelumnya mengatakan bahwa pengaruh infeksi *Toxoplasma gondii* menyebabkan terjadinya peningkatan IFN- $\gamma$  dan TNF- $\alpha$  (Suwanti, 2005) di mana kedua sitokin tersebut merupakan sitokin proinflamasi yang bertujuan untuk membunuh parasit tetapi karena berlebihan menimbulkan kerusakan jaringan. Mencit yang diimunisasi dengan Ig Y anti ESA, tingkat kerusakan plasenta masih cukup tinggi, artinya imunisasi dengan Ig Y anti ESA tidak dapat menurunkan tingkat kerusakan plasenta sedangkan mencit yang mendapatkan imunisasi Ig Y anti antigen membran tingkat kerusakan plasenta dapat ditekan.

**Tabel 3. Rata-rata dan Simpangan Baku Skor Kerusakan Plasenta Mencit yang Mendapatkan Infeksi *T. gondii* pada Umur Kebuntingan 9,5 hari**

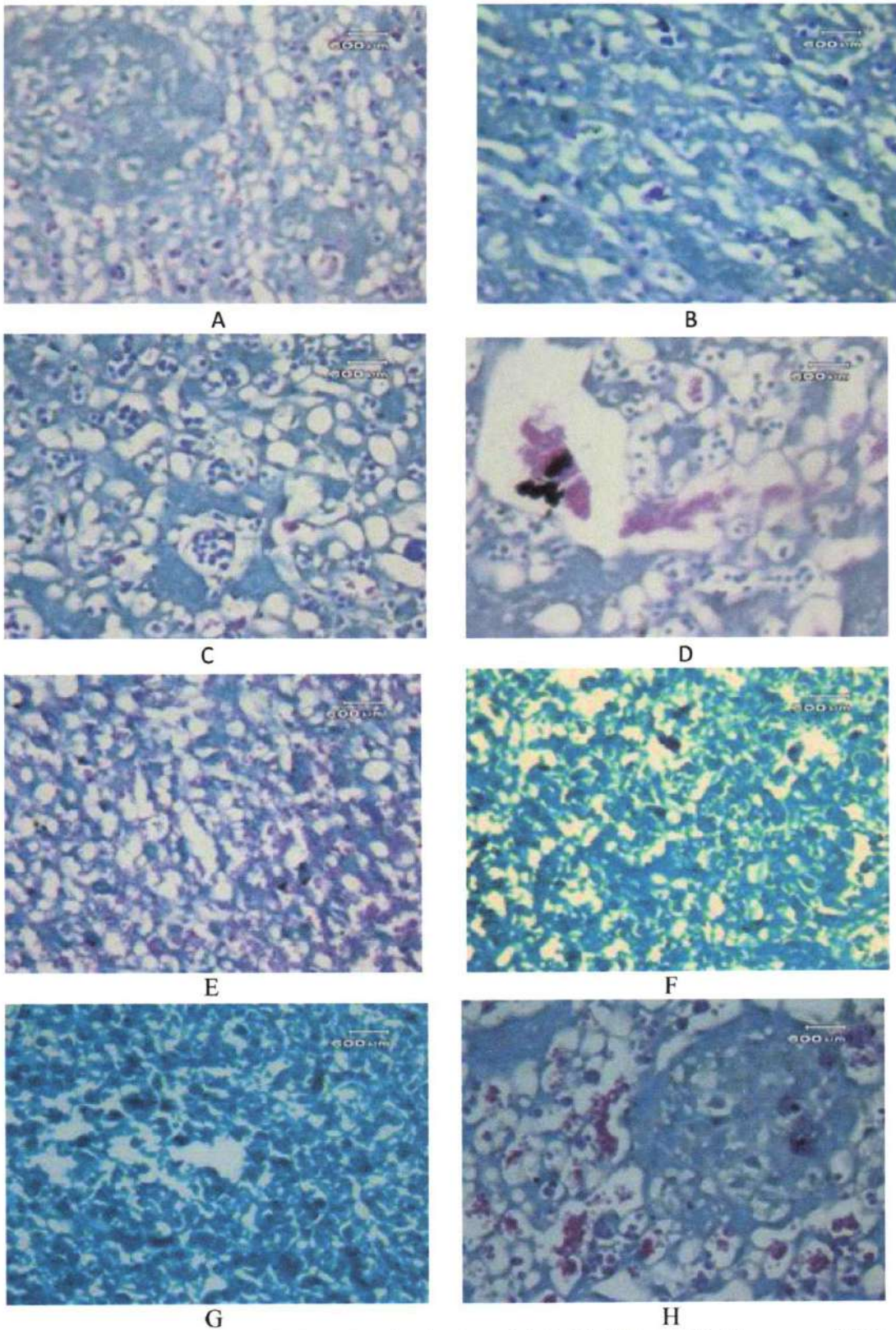
Perlakuan	Rata-rata dan Simpangan Baku
Kontrol Negatif	$0 \pm 0^a$
Kontrol Positif	$1,8 \pm 0,43^b$
Mencit Yang diimunisasi Ig Y anti ESA	$1,2 \pm 0,43^{bc}$
Mencit Yang diimunisasi Ig Y anti Antigen Membran	$0,6 \pm 0,53^{bc}$

Keterangan: notasi yang berbeda menunjukkan ada perbedaan yang nyata ( $p < 0,05$ )





Gambar 3. Histopatologi Plasenta Mencit 4 hari setelah infeksi *T. gondii*. (HE, 400x) Infeksi pada umur kebuntigan 9,5 hari (A,B,C,D), 14,5 hari (E,F,G,H). Kontrol Negatif (A, E), Kontrol Positif (B,F), Imunisasi anti ESA (C,G), Imunisasi anti antigen membran (D,H)



Gambar 4. Apoptosis Trofoblas Mencit 4 hari setelah infeksi *T. gondii*. (Apoptag, 400x) Infeksi pada umur kebuntuan 9,5 hari (A,B,C,D), 14,5 hari (E,F,G,H). Kontrol Negatif (A, E), Kontrol Positif (B,F), Imunisasi anti ESA (C,G), Imunisasi anti antigen membran (D,H)

### 5.1.3. Index Apoptosis Plasenta

Hasil perhitungan indeks apoptosis menunjukkan bahwa perlakuan imunisasi menurunkan indeks apoptosis trofoblas apabila dibanding dengan kontrol positif (Tabel 4), terdapat perbedaan yang sangat nyata antara perlakuan imunisasi dengan kontrol positif. Indeks apoptosis trofoblas mencit yang mendapatkan imunisasi baik Ig Y anti-ESA maupun antigen membran masih lebih tinggi dari kelompok kontrol negatif artinya perlindungan imunisasi terhadap indeks apoptosis akibat infeksi *T. gondii* belum maksimal. Hal ini merupakan penjelasan mengapa pada kelompok imunisasi masih terjadi abortus. Peningkatan apoptosis merupakan keadaan patologis dan peningkatan apoptosis pada trofoblas mengakibatkan kegagalan kebuntingan (abortus) (Suwanti, 2005).

**Tabel 4. Rata-rata dan Simpangan Baku Indeks Apoptosis Trofoblas Plasenta Mencit yang Mendapatkan Infeksi *T. gondii* pada Umur Kebuntingan 9,5 hari**

Perlakuan	Rata-rata dan Simpangan Baku (dalam persen)
Kontrol Negatif	7,34 ± 1,79 <sup>a</sup>
Kontrol Positif	34,31 ± 3,04 <sup>b</sup>
Mencit Yang dimunisasi Ig Y anti ESA	15,37 ± 4,69 <sup>c</sup>
Mencit Yang dimunisasi Ig Y anti Antigen Membran	14,67 ± 3,45 <sup>c</sup>

Keterangan: notasi yang berbeda menunjukkan ada perbedaan yang nyata ( $p < 0,05$ )

### 5.1.4. Tingkat Kesakitan

Tingkat kesakitan diukur dengan waktu induk semang menunjukkan gejala klinis pertama dan dihitung sejak mencit diinfeksi dengan *T. gondii*. Gejala klinis awal mencit yang diinfeksi *T. gondii* meliputi bulu kusam (berdiri), mencit tidak lincah dan nafsu makan menurun. Gejala yang berlanjut dan dinyatakan parah apabila nafas sudah tersengal-sengal dan berakhir dengan kematian.

Dari tabel 5, terlihat bahwa mencit pada kelompok kontrol positif, di mana mencit tidak diimunisasi menunjukkan gejala klinis lima hari setelah infeksi. Kelompok mencit yang diimunisasi, gejala klinis muncul enam hari setelah infeksi. Pada analisis statistik tidak muncul angka signifikansi dari perlakuan. Meski demikian kalau hanya dilihat dari waktu, hal ini menunjukkan adanya perpanjangan waktu mencit menunjukkan gejala klinis pada kelompok yang diimunisasi. Dari hasil ini dapat dikatakan bahwa imunisasi Ig Y, baik anti ESA maupun anti-antigen membran meningkatkan daya tahan tubuh mencit dengan ditunjukkan perpanjangan waktu timbulnya gejala klinis.

**Tabel 5. Rata-rata dan Simpangan Baku Lama Waktu Mencit Menunjukkan Gejala Klinis Setelah Diinfeksi *T. gondii* pada Umur Kebuntingan 9,5 hari**

Perlakuan	Rata-rata dan Simpangan Baku (dalam hari)
Kontrol Positif	5 ± 0
Mencit Yang diimunisasi Ig Y anti ESA	6 ± 0
Mencit Yang diimunisasi Ig Y anti Antigen Membran	6 ± 0

Gejala klinis pada kelompok yang tidak diimunisasi pada penelitian ini lebih panjang dari hasil penelitian Suwanti (2005). Hal ini dikarenakan pada penelitian sebelumnya (Suwanti, 2005) menggunakan dosis  $10^3$  takizoit per ekor mencit sedangkan pada penelitian ini menggunakan dosis infeksi 10 takizoit. Pada penelitian ini digunakan dosis lebih rendah karena diharapkan mencit dapat bertahan hidup sehingga gejala abortus dapat diamati, dan ini sesuai dengan penelitian Mufasirin (2009).

#### 5.1.5. Lama Waktu Induk Bertahan Hidup

Lama waktu induk mencit bertahan hidup dihitung mulai saat mencit bunting mendapatkan infeksi *T. gondii* sampai saat mencit mati. Satuan waktu yang digunakan hari. Apabila kematian terjadi pada pagi - siang hari (sesuai saat menginfeksi) dihitung hari penuh,

tetapi apabila kematian terjadi pada malam hari dihitung setengah hari. Peneliti melakukan infeksi antara jam 11.00 – 12.00 WIB.

**Tabel 6. Rata-rata dan Simpangan Baku Lama Waktu Induk bertahan Hidup Setelah Infeksi *T. gondii* pada Umur Kebuntingan 9,5 Hari**

Perlakuan	Rata-rata dan Simpangan Baku (dalam hari)
Kontrol Positif	$7 \pm 0^a$
Mencit Yang dimunisasi Ig Y anti ESA	$7,6 \pm 0,42^b$
Mencit Yang dimunisasi Ig Y anti Antigen Membran	$7,7 \pm 0,27^b$

Keterangan: notasi yang berbeda menunjukkan ada perbedaan yang nyata ( $p < 0,05$ )

Hasil pengamatan menunjukkan bahwa imunisasi, baik menggunakan Ig Y anti-ESA maupun anti-antigen membran, memperpanjang waktu mencit bertahan hidup (Tabel 4). Pada kelompok mencit yang tidak mendapatkan infeksi, kematian semua terjadi pada hari ketujuh setelah infeksi, sedangkan pada kelompok yang diimunisasi dengan Ig Y anti-ESA kematian mulai terjadi pada hari ketujuh sampai hari ke 8 dengan rata-rata 7,6 hari setelah infeksi. Kematian mencit yang diimunisasi dengan Ig Y anti-antigen membran mulai pada hari ke7,5 hari sampai ke 8 dengan rata-rata hari ke 7,7 setelah infeksi. Berdasarkan pengalaman peneliti (tidak ada publikasi) kematian terjadi 1 sampai 2 hari setelah mencit menunjukkan gejala klinis. Perpanjangan induk mencit pada kelompok yang diimunisasi berarti Ig Y baik Ig Y anti-ESA maupun anti-antigen membran *T. gondii* melindungi terhadap infeksi meskipun tidak sempurna. Perlindungan tidak sempurna karena semua mencit perlakuan (setelah infeksi) mati semua. Jadi perlindungan di sini hanya memperpanjang waktu hidup dari mencit terinfeksi. Perlindungan yang tidak maksimal ini kemungkinan karena dosis infeksi yang kurang atau mungkin imunisasi perlu diulang. Untuk membenarkan asumsi ini perlu dilakukan penelitian lanjutan untuk menentukan dosis dan ulangan imunisasi.

Semua Hewan coba sudah mati sebelum saat melahirkan, sehingga data jumlah anak yang lahir dan mati pada saat kelahiran tidak ada. Mencit melahirkan pada umur kebuntingan 20-21 hari. Mencit yang mati pada hari kedelapan setelah infeksi artinya umur kebuntingan mencit baru mencapai 17,5 hari.

#### 5.1.6. Kejadian Abortus

Kejadian abortus pada penelitian ini yang diamati adalah ada tidaknya kejadian abortus dan lama kejadian abortus yang dihitung mulai dari saat infeksi sampai kejadian abortus awal pada setiap mencit perlakuan. Pada semua mencit perlakuan baik yang diimunisasi maupun yang tidak imunisasi terjadi abortus tetapi awal kejadian abortus yang berbeda. Kejadian abortus pada semua mencit perlakuan menandakan Ig Y yang dihasilkan belum dapat melindungi terhadap kejadian abortus. Hal ini kemungkinan karena dosis imunisasi yang masih kurang. Untuk mendapatkan dosis yang tepat dan efektif dalam melindungi mencit dari aortus perlu dilakukan penelitian lebih lanjut. Hipotesis ini diajukan karena dukungan dari data waktu terjadinya abortus yang berbeda pada kelompok yang diimunisasi dan yang tidak diimunisasi. Kenyataan lain yang mendukung hipotesis tersebut adalah bahwa fetus yang diabortuskan oleh mencit yang tidak diinfeksi sebagian besar hancur (data tidak ditampilkan), bahkan ada satu ekor mencit induk fetus yang diabortuskan hancur semuanya, sedangkan pada yang diimunisasi sebagian fetus masih berbentuk meski mengecil.

**Tabel 7. Rata-rata dan Simpangan Waktu Kejadian Abortus Setelah Mencit diinfeksi *T. gondii* pada Umur Kebuntingan 9,5 Hari**

Perlakuan	Rata-rata dan Simpangan Baku (dalam hari)
Kontrol Positif	6,2 ± 0,45 <sup>a</sup>
Mencit Yang dimunisasi Ig Y anti ESA	7,2 ± 0,27 <sup>b</sup>
Mencit Yang dimunisasi Ig Y anti Antigen Membran	7,4 ± 0,42 <sup>b</sup>

Keterangan: notasi yang berbeda menunjukkan ada perbedaan yang nyata ( $p < 0,05$ )

Hasil Pengamatan waktu terjadinya abortus dapat dibaca pada tabel 7. Pada kelompok yang tidak diimunisasi lebih cepat terjadi abortus, dari lima ekor mencit yang diinfeksi, empat ekor mengalami abortus pada 6 hari dan 1 ekor pada hari ke tujuh dengan rata-rata abortus terjadi pada 6,2 hari setelah infeksi. Mencit yang mendapatkan imunisasi menunjukkan perpanjangan waktu terjadinya abortus. Mencit yang mendapat imunisasi Ig Y anti-ESA *T. gondii*, abortus baru muncul 7,2 hari setelah infeksi dan yang diimunisasi dengan Ig Y anti-antigen membran, abortus terjadi 7,2 hari setelah infeksi. Baik yang dimunisasi kedua jenis Ig Y tersebut tidak berbeda nyata dan berbeda sangat nyata dengan kelompok yang tidak diinfeksi. Hal ini berarti kedua jenis Ig Y mempunyai potensi memperpanjang waktu terjadinya abortus.

#### 5.1.7. Angka Penularan ke Anak/Fetus

Seperti sudah diterangkan di atas bahwa semua mencit perlakuan mengalami abortus akhirnya mati sebelum melahirkan anak, maka data angka penularan di sini adalah fetus yang masih di dalam uterus mencit yang mengalami kematian. Fetus yang diabortuskan tidak dilakukan pengamatan, karena menurut Jenum *et al.* (1998) fetus yang diabortuskan bukan karena tertular atau terinfeksi dari Ibu yang terinfeksi *T. gondii*.

Dari tabel 8, dapat diketahui bahwa ada perbedaan yang nyata angka penularan dari induk ke fetus, baik mencit yang diinfeksi yang mendapat imunisasi dan yang tidak diimunisasi. Meskipun imunisasi masih memberikan peluang terjadinya penularan, tetapi persentase angka penularannya menurun. Antara perlakuan mencit yang dimunisasi Ig Y anti-Esa dan anti-antigen membran tidak berbeda nyata. Artinya kedua Ig Y tersebut kemampuan untuk menurunkan angka penularan sama.

**Tabel 8. Rata-rata dan Simpangan Angka Penularan dari Induk yang Diinfeksi *T. gondii* pada umur Kebuntingan 9,5 Hari ke Fetus**

Perlakuan	Rata-rata dan Simpangan Baku (dalam persen)
Kontrol Positif	37,59 ± 5,51 <sup>a</sup>
Mencit Yang dimunisasi Ig Y anti ESA	26,96 ± 4,74 <sup>b</sup>
Mencit Yang dimunisasi Ig Y anti Antigen Membran	28,37 ± 6,11 <sup>b</sup>

Keterangan: notasi yang sama menunjukkan tidak ada perbedaan yang nyata ( $p > 0,05$ )

## 5.2. Hasil imunisasi dengan Ig Y pada mencit yang diinfeksi *T. gondii* pada umur kebuntingan 14,5 hari

Secara umum hasil penelitian aplikasi Ig Y sebagai imunoprofilaksis pada mencit yang diinfeksi pada umur kebuntingan 14,5 hari tidak efektif. Hal ini ditunjukkan dari semua variabel pengamatan antara kelompok mencit tidak diimunisasi dengan mencit yang diimunisasi tidak menunjukkan adanya perbedaan ( $p > 0,05$ ). Hasil sangat berbeda bila dibandingkan dengan imunisasi yang diberikan pada mencit yang mendapatkan infeksi pada umur kebuntingan 9,5 hari. Pada mencit yang diinfeksi pada umur kebuntingan 9,5 hari, meskipun imunisasi tidak dapat melindungi sempurna setidaknya imunisasi dapat meningkatkan kualitas hidup dari mencit dan fetusnya. Dari data ini dapat dihipotesiskan imunisasi akan lebih efektif kalau diberikan sedini mungkin atau selagi umur kebuntingan masih muda bahkan mungkin sebelum terjadi kebuntingan. Hipotesis ini harus dibuktikan dengan penelitian lanjut.

Secara rinci hasil pengamatan setiap variabel dapat dilihat sebagai berikut:

### 5.2.1. Jumlah dan Berat Fetus

Hasil penghitungan jumlah fetus dari setiap mencit perlakuan sama (Tabel 9). Hasil ini konsisten dengan jumlah fetus pada mencit yang diinfeksi pada umur kebuntingan 9,5 hari. Dari hasil ini dapat disimpulkan infeksi *T. gondii* tidak menurunkan jumlah fetus. Tidak terjadinya penurunan jumlah ini karena semua fetus, baik yang normal maupun yang



mengecil dihitung. Pada mencit bunting, umur kebuntingan 9 hari, plasentasi sudah sempurna dan organogenesis mulai pada hari ke 10. (Arvola, 2001; Clark *et al.*, 2001), artinya sebelum mendapatkan infeksi baik pada umur kebuntingan 9,5 hari maupun 14,5 hari di dalam uterus sudah terlihat adanya fetus. Dan penghitungan fetus dengan cara menghitung jumlah plasenta (cotiledon), setiap fetus mempunyai satu plasenta.

**Tabel 9. Rata-rata dan Simpangan Baku Jumlah Fetus Mencit Empat Hari Setelah Infeksi pada Umur Kebuntingan 14,5 hari**

Perlakuan	Rata-rata dan Simpangan Baku
Kontrol Negatif	$10 \pm 2^a$
Kontrol Positif	$10 \pm 1^a$
Mencit Yang dimunisasi Ig Y anti ESA	$11 \pm 1^a$
Mencit Yang dimunisasi Ig Y anti Antigen Membran	$10 \pm 2^a$

Keterangan: notasi yang sama menunjukkan tidak ada perbedaan ( $p > 0,05$ )

**Tabel 10. Rata-rata dan Simpangan Baku Berat Fetus Mencit Empat Hari Setelah Infeksi pada Umur Kebuntingan 14,5 Hari**

Perlakuan	Rata-rata dan Simpangan Baku (dalam gram)
Kontrol Negatif	$0,896 \pm 0,231^a$
Kontrol Positif	$0,850 \pm 0,223^a$
Mencit Yang dimunisasi Ig Y anti ESA	$0,934 \pm 0,086^a$
Mencit Yang dimunisasi Ig Y anti Antigen Membran	$1,098 \pm 0,189^a$

Keterangan: notasi yang sama menunjukkan tidak ada perbedaan ( $p > 0,05$ )

Berat fetus mencit pada setiap kelompok perlakuan tidak menunjukkan perbedaan (Tabel 10). Hasil ini berbeda dengan hasil pengamatan berat fetus mencit yang diinfeksi pada umur kebuntingan 9,5 hari. Hal ini kemungkinan pada mencit yang diinfeksi 9,5 hari baru mulai terjadi organogenesis, menurut Arvola (2001) dan Clark *et al.*, (2001) organogenesis

mencit mulai terjadi pada hari ke 10. Pada penelitian sebelumnya (Suwanti 2010), diperoleh hasil bahwa infeksi *T. gondii* mengganggu perkembangan embrio ayam berupa penurunan jumlah somite dan panjang embrio. Hasil ini juga sesuai dengan yang dilaporkan Que *et al.* (2004) embrio ayam yang diinfeksi pada umur 12 hari terjadi menghambat pertumbuhan perkembangan embrio yang dimanifestasikan dengan penurunan berat embrio dan organ-organ embrio.

Apabila dibandingkan dengan Laporan Suwanti (2009), yang sama-sama infeksi *T. gondii* diberikan pada umur kebuntingan 14,5 hari, ada perbedaan hasil pada kelompok mencit yang diinfeksi dibandingkan dengan kelompok kontrol (tanpa infeksi). Hasil Suwanti (2009) menunjukkan ada penurunan berat fetus, sedangkan pada penelitian ini tidak. Perbedaan ini kemungkinan disebabkan perbedaan dosis infeksi, pada penelitian ini digunakan dosis 10 takizoit, sedangkan penelitian sebelumnya digunakan  $10^3$  takizoit per ekor mencit.

Meskipun berat fetus tidak berbeda nyata tetapi pada kelompok yang diinfeksi dan tidak diimunisasi ada fetus yang mengalami perkembangan mengecil dan pada saat diambil sudah hancur sehingga tidak diketahui beratnya. Sedangkan pada kelompok kontrol negatif dan mencit yang mendapat imunisasi baik Ig Y anti-ESA maupun anti-membran fetus normal semua.

### **5.2.2. Histopatologi Plasenta**

Hasil skor kerusakan plasenta mencit yang mendapat infeksi pada umur 14,5 hari tertuang pada tabel 11. Sama seperti pada infeksi umur kebuntingan 9,5 hari, ig Y anti-ESA tidak mampu menurunkan tingkat kerusakan plasenta, tetapi imunisasi Ig Y anti-antigen membran mampu menekan tingkat kerusakan dan nilainya sama dengan kontrol negatif. Pada penelitian ini kontrol negatif menunjukkan skor di atas 2. Keradangan pada kasus ini bukan

patologis tetapi fisiologis karena pengamatan dilakukan pada umur kebuntingan 18,5 hari di mana tinggal 1 hari lagi mencit melahirkan.

**Tabel 11. Rata-rata dan Simpangan Baku Skor Kerusakan Plasenta Mencit yang Mendapatkan Infeksi *T. gondii* pada Umur Kebuntingan 14,5 hari**

Perlakuan	Rata-rata dan Simpangan Baku
Kontrol Negatif	2,4 ± 0,53 <sup>a</sup>
Kontrol Positif	3,4 ± 0,53 <sup>b</sup>
Mencit Yang dimunisasi Ig Y anti ESA	3,2 ± 0,43 <sup>bc</sup>
Mencit Yang dimunisasi Ig Y anti Antigen Membran	2,4 ± 0,53 <sup>ac</sup>

Keterangan: notasi yang berbeda menunjukkan ada perbedaan yang nyata ( $p < 0,05$ )

### 5.2.3. Index Apoptosis Plasenta

Hasil perhitungan statistik indeks apoptosis trofoblas pada mencit yang diinfeksi pada umur kebuntingan 14,5 hari menunjukkan semua perlakuan tidak berbeda nyata (Tabel 12). Pada kelompok negatif di mana mencit tidak mendapatkan infeksi indeks apoptosisnya cukup tinggi yaitu 33,41%. Hasil ini sama dengan penelitian sebelumnya (Suwanti, 2005) dan apoptosis pada kasus ini merupakan keadaan fisiologis karena umur kebuntingan mencit pada kelompok ini mendekati kelahiran. Pada saat sebelum kelahiran normal terjadi peningkatan apoptosis. Apabila dibandingkan dengan penelitian sebelumnya, indek apoptosis pada kelompok kontrol positif lebih rendah, hal ini karena pada penelitian ini menggunakan dosis infeksi 10 takizoit per ekor mencit sedangkan penelitian Suwanti (2005) menggunakan dosis infeksi 10<sup>3</sup> takizoit per ekor mencit.

**Tabel 12. Rata-rata dan Simpangan Baku Indeks Apoptosis Trofoblas Plasenta Mencit yang Mendapatkan Infeksi *T. gondii* pada Umur Kebuntingan 14,5 hari**

Perlakuan	Rata-rata dan Simpangan Baku (dalam persen)
Kontrol Negatif	33,41 ± 2,50 <sup>a</sup>
Kontrol Positif	36,74 ± 5,95 <sup>a</sup>
Mencit Yang dimunisasi Ig Y anti ESA	34,68 ± 3,82 <sup>a</sup>
Mencit Yang dimunisasi Ig Y anti Antigen Membran	33,02 ± 0,86 <sup>a</sup>

Keterangan: notasi yang sama menunjukkan tidak ada perbedaan yang nyata ( $p > 0,05$ )

#### 5.2.4. Waktu Induk Menunjukkan Gejala Klinis

Hasil penghitungan statistik lama waktu induk menunjukkan gejala klinis setelah diinfeksi *T. gondii* pada setiap peralakuan tidak berbeda nyata ( $p > 0,05$ ) (tabel 13). Jadi imunisasi dengan Ig Y anti-ESA dan anti-antigen membran tidak mampu memperpanjang waktu timbulnya gejala klinis, meskipun secara angka terdapat perpanjangan.

**Tabel 13. Rata-rata dan Simpangan Baku Lama Waktu Mencit Menunjukkan Gejala Klinis Setelah Infeksi *T. gondii* pada Umur Kebuntingan 14,5 Hari**

Perlakuan	Rata-rata dan Simpangan Baku (dalam hari)
Kontrol Positif	6,4 ± 0,55 <sup>a</sup>
Mencit Yang dimunisasi Ig Y anti ESA	6,6 ± 0,55 <sup>a</sup>
Mencit Yang dimunisasi Ig Y anti Antigen Membran	7 ± 1 <sup>a</sup>

Keterangan: notasi yang sama menunjukkan tidak ada perbedaan ( $p > 0,05$ ).

#### 5.2.5. Lama Waktu Induk Bertahan Hidup

Sama seperti penghitungan statistik lama waktu induk menunjukkan gejala klinis, lama induk bertahan hidup setelah diinfeksi *T. gondii* pada setiap peralakuan tidak berbeda nyata ( $p > 0,05$ ) (tabel 14), meskipun secara angka terdapat perpanjangan waktu pada mencit yang mendapat imunisasi Ig Y. Jadi imunisasi dengan Ig Y anti-ESA dan anti-antigen

membran tidak mampu memperpanjang waktu mencit bertahan hidup. Pada akhirnya semua mencit mati. Hal ini juga berarti imunisasi dengan Ig Y tidak melindungi mencit dari infeksi *T. gondii*.

**Tabel 14. Rata-rata dan Simpangan Baku Lama Waktu Induk Bertahan Hidup Setelah Infeksi *T. gondii* pada Umur Kebuntingan 14,5 Hari**

Perlakuan	Rata-rata dan Simpangan Baku (dalam hari)
Kontrol Positif	8,4 ± 0,55 <sup>a</sup>
Mencit Yang dimunisasi Ig Y anti ESA	8,6 ± 0,55 <sup>a</sup>
Mencit Yang dimunisasi Ig Y anti Antigen Membran	9 ± 1 <sup>a</sup>

Keterangan: notasi yang sama menunjukkan tidak ada perbedaan ( $p > 0,05$ )

#### 5.2.6. Kejadian Abortus

Mencit pada penelitian ini diinfeksi pada umur kebuntingan 14,5 hari, hal ini setara dengan kehamilan trimester ke 3 pada manusia. Menurut *Pediatric Database* (1994), infeksi pada umur kebuntingan trimester ketiga tidak ada gejala abortus, secara lengkap dikatakan bahwa infeksi pada umur kehamilan trimester pertama, angka penularan 17% dengan resiko abortus spontan, infeksi trimester kedua angka penularan 25% dengan resiko abortus spontan atau fetus terinfeksi berat dan infeksi pada kehamilan trimester ketiga angka penularannya 65% dengan resiko fetus terinfeksi ringan. Pada penelitian ini 2 ekor mencit dari kelompok infeksi tanpa diimunisasi dan dimunisasi Ig Y anti-antigen membran dan 1 ekor mencit yang dimunisasi Ig Y anti-ESA mengalami kelahiran yang maju 2 hari, atau 4 hari setelah infeksi. Lahir maju ini kami hitung sebagai kejadian abortus, tetapi juga masukkan pada data jumlah anak yang dilahirkan dan berat lahir kami ukur. Dimasukkan abortus karena lahirnya maju dari waktu kelahiran, dimasukkan lahir karena fetus yang dilahirkan sudah lengkap dan normal, kecuali 1 ekor mencit yang tidak dimunisasi, sebagian besar fetus yang dilahirkan

mati (Gambar 6). Karena jumlahnya yang hanya 1- 2 ekor yang mengalami abortus, tidak dapat dianalisis secara statistik.



Gambar 5. Anak mencit yang dilahirkan dari induk mencit terinfeksi *T. gondii*. Kelahiran maju kurang dari waktu kelahiran (umur kebuntingan 18,5 hari). A. Fetus yang mati, dilahirkan oleh 1 ekor mencit yang tidak diimunisasi. B. Fetus yang masih bertahan hidup, dilahirkan oleh mencit yang diimunisasi Ig Y.

#### 5.2.7. Jumlah Anak yang Dilahirkan

Dari Tabel 15 terlihat bahwa jumlah anak yang dilahirkan mencit dari setiap perlakuan tidak berbeda nyata ( $p > 0,05$ ) artinya jumlah anak yang dilahirkan tidak terpengaruh oleh perlakuan. Namun demikian pada kelompok yang diinfeksi tetapi tidak diimunisasi, satu ekor mencit, melahirkan sebagian besar anak mencit mati (Gambar 3) dan satu ekor lagi, satu anak mencit cacat.

Tabel 15. Rata-rata dan Simpangan Baku Jumlah Anak yang Dilahirkan pada Mencit yang Diinfeksi pada Umur Kebuntingan 14,5 Hari

Perlakuan	Rata-rata dan Simpangan Baku
Kontrol Negatif	$9 \pm 2^a$
Kontrol Positif	$10 \pm 1^a$
Mencit Yang diimunisasi Ig Y anti ESA	$9 \pm 2^a$
Mencit Yang diimunisasi Ig Y anti Antigen Membran	$8 \pm 1^a$

Keterangan: notasi yang sama menunjukkan tidak ada perbedaan ( $p > 0,05$ )

### 5.2.8. Berat Anak yang Dilahirkan

Konsisten dengan hasil berat fetus yang tidak berbeda nyata pada setiap perlakuan, berat lahir anak baik yang normal (kontrol negatif), yang diinfeksi dan tidak diimunisasi (kontrol positif), maupun yang diinfeksi dan diimmunisasi Ig Y tidak berbeda nyata ( $p > 0,05$ ) (Tabel 16)

**Tabel 16. Rata-rata dan Simpangan Baku Berat Lahir Anak Mencit yang Dilahirkan Mencit yang Diinfeksi pada Umur Kebuntingan 14,5 Hari**

Perlakuan	Rata-rata dan Simpangan Baku
Kontrol Negatif	1,49 ± 0,13 <sup>a</sup>
Kontrol Positif	1,39 ± 0,62 <sup>a</sup>
Mencit Yang diimunisasi Ig Y anti ESA	1,33 ± 0,09 <sup>a</sup>
Mencit Yang diimunisasi Ig Y anti Antigen Membran	1,49 ± 0,19 <sup>a</sup>

Keterangan: notasi yang sama menunjukkan tidak ada perbedaan ( $p > 0,05$ )

### 5.2.9. Angka Penularan ke Anak

Hasil perhitungan statistik terhadap data angka penularan *T. gondii* dari induk yang diinfeksi ke fetusnya menunjukkan bahwa tidak ada perbedaan yang nyata antara mencit yang diimunisasi dan yang tidak (Tabel 17). Dari hasil ini dapat dikatakan bahwa imunisasi Ig Y sehari sebelum infeksi pada umur kebuntingan 14,5 hari tidak dapat menekan angka penularan *T. gondii*. Hal ini berbeda dengan hasil pada infeksi 9,5 hari.

**Tabel 17. Rata-rata dan Simpangan Baku Angka Penularan dari Induk yang Diinfeksi *T. gondii* pada umur kebuntingan 14,5 hari ke Fetus**

Perlakuan	Rata-rata dan Simpangan Baku (dalam persen)
Kontrol Positif	39,31 ± 5,83 <sup>a</sup>
Mencit Yang diimunisasi Ig Y anti ESA	37,40 ± 4,17 <sup>a</sup>
Mencit Yang diimunisasi Ig Y anti Antigen Membran	37,38 ± 7,96 <sup>a</sup>

Keterangan: notasi yang sama menunjukkan tidak ada perbedaan ( $p > 0,05$ )

## **BAB VI**

### **KESIMPULAN DAN SARAN**

#### **Kesimpulan**

1. Secara keseluruhan hasil pengamatan imunisasi Ig Y melindungi dari infeksi *T. gondii* meskipun belum sempurna
2. Imunisasi yang dilakukan pada induk yang mendapat infeksi dini lebih baik dari pada infeksi pada umur kebuntingan trimester ketiga
3. Tidak ada perbedaan kemampuan Ig Y anti-ESA dan anti antigen membran dalam perlindungan melawan infeksi *T. gondii*.

#### **Saran**

1. Perlakukan penelitian lanjut untuk menentukan dosis imunisasi, jangka waktu imunisasi dan ulangan imunisasi serta waktu yang tepat memberikan imunisasi apakah sebelum kebuntingan ataupun setelah kebuntingan serta umur kebuntingan yang tepat saat mendapatkan imunisasi.
2. Penelitian dapat dilanjutkan untuk tahap III untuk mengetahui kemampuan Ig Y sebagai bahan terapi.



## BAB VII

### RENCANA/PENELITIAN TAHAP SELANJUTNYA

Penelitian direncanakan dikerjakan selama 3 tahun.

#### **Rencana Tahun (Tahap) 3: Aplikasi Antibodi (Ig Y Antitoxoplasma sebagai imunoterapi mencit bunting diinfeksi dengan *T. gondii***

##### **A. Tujuan Khusus**

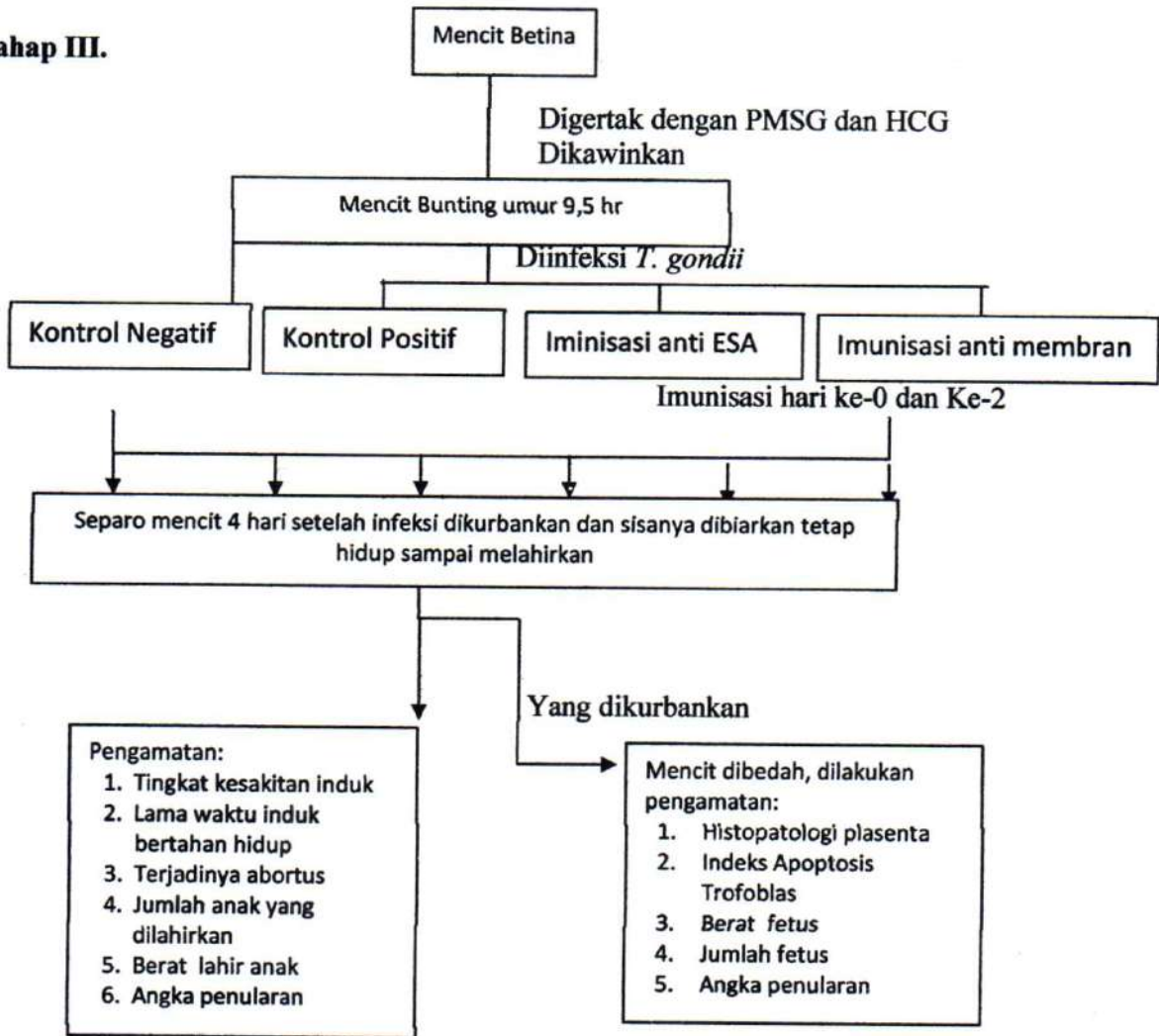
1. Pada tahap ini penelitian bertujuan membuktikan Ig Y yang dihasilkan pada tahap I mampu mengobati (sebagai bahan imunoterapi) infeksi *T. gondii* pada mencit bunting.
2. Membantu ketepatan kelulusan mahasiswa S2 IPKMV karena pada tahap ini direncanakan melibatkan 2 mahasiswa S2 IPKMV.

##### **B. Metode**

**Bahan Imunoterapi :** Ig Y anti ES dan anti membran *T. gondii*

**Aplikasi Imunoterapi:** Mencit betina bunting yang diinfeksi *T.gondii* diterapi dengan dengan Ig Y. Cara terapi mengikuti hasil optimalisasi pada tahun kedua. Mencit betina digertak birahi dengan PMSG dan HCG dan dikawinkan. Mencit bunting umur kebuntingan 9,5 hari diinfeksi dengan *T. gondii*. Mencit terinfeksi diterapi dengan Ig Y pada hari keenol pascainfeksi (bersamaan dengan infeksi) dan dua hari setelah infeksi. Empat hari setelah infeksi separo mencit bunting dikurbankan, separo sisanya dibiarkan tetap hidup sampai melahirkan. Mencit yang dikurbankan, diambil uterus dan diamati jumlah fetus, berat fetus, histopatologi plasenta dengan pengecatan HE dan pengamatan indeks apoptosis. Sedang mencit yang tetap dibiarkan hidup diamati tingkat kesakitan induk (gejala klinis), lama waktu induk bertahan hidup setelah infeksi, terjadinya abortus, jumlah anak yang dilahirkan, berat lahir anak dan angka penularan. Bagan alir pada tahun ketiga adalah sebagai berikut.

**Tahap III.**



**C. Jadwal Kerja**

No	KEGIATAN	BULAN						
		1	2	3	4	5	6	7
1	Persiapan alat dan hewan coba	xxx						
2	Gertak birahi dan pembuntingan mencit		xxx					
3	Infeksi mencit Bunting, terapi dan pengamatan gejala klinis			xxx	xxx			
4	Pembuatan preparat histopat dan pengamatan				xxx	xxx		
5	Analisis data					xxx	xxx	
6	Laporan , seminar dan publikasi						xxx	xxx

## DAFTAR PUSTAKA

- Chalghoumi R., Beckers Y., Portetelle D., and Thewia W., 2009. Hen egg yolk antibodies (IgY), production and use for passive immunization against bacterial enteric infections in chicken: a review. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 13(2), 295-308
- Chernysheva L.V., Friendship R.M., DVMDewey C.E., and Gyles C.L., 2004. The effect of dietary chicken egg-yolk antibodies on the clinical response in weaned pigs challenged with a K88+ *Escherichia coli* isolate *Journal of Swine Health and Production* 12 (3):119-122
- Denkers, E.Y and R.T. Gazzinelli. 1998. Regulation and Function of T-Cell-Mediated Immunity during *Toxoplasma gondii* Infection. *Clin. Microbiol. Rev.*;11 (4):569-588
- Dubey JP, Lindsay DS, Speer CA, 1998. Structures of *Toxoplasma gondii* Tachyzoites, Bradyzoites, and Sporozoites and Biology and Development of Tissue Cysts. *CMR*, 11 (2): 267-299.
- Dupouy-Camet J, 2002. Immunopathogenesis of Toxoplasmosis in Pregnancy Document online: <http://www.users.imagnet.fr/dupouyca/toxoplasmosis> diakses tanggal 5-4-2002 jam 07:00
- Ghaffar A, 2001. Blood and Tissue Protozoa, MBIM 650/750 Medical Microbiology. Document online URL: <http://www.med.sc.edu:85/parasitology/blood-proto.htm> diakses tanggal 1-2-2005 jam 07:00
- Ko K. Y. and Ahn D. U.. 2007. Preparation of Immunoglobulin Y from Egg Yolk Using Ammonium Sulfate Precipitation and Ion Exchange Chromatography. *Poultry Science* 86:400-407
- Lee E.N, Sunwoo H. H., Menninen K.and Sim J. S. 2002 .In Vitro Studies of Chicken Egg Yolk Antibody (IgY) Against *Salmonella enteritidis* and *Salmonella typhimurium*, *Poultry Science* 81:632-641
- Michael A., Meenatchisundaram S., Parameswari G., Subraj T., Selvakumaran R. and Ramalingam S. 2010. Chicken egg yolk antibodies (IgY) as an alternative to mammalian antibodies. *Indian J.Sci.Technol.* 3 (4): 468-474
- Nili N., Samie A.H. and Soleimmanian-Zad S. 2010. Chicken Egg Yolk Antibody (IgY) Powder Against *Escherichia coli* O78:K80. *J. Anima. Vet. Adv.*, 9 (2): 366-374
- Paryati A.P.Y., Wibawa I.W.T., Soedjono R.D., dan Pasaribu F.H. 2006. Imunoglobulin Ayam sebagai Antibodi Anti-idiotipe terhadap Rabies. *J.Vet.* 7 (3): 92-103
- Pauly D., Dorner M., Zhang X., Hlinak A., Dorner B., and Schade R. 2009. Monitoring of laying capacity, immunoglobulin Y concentration, and antibody titer development in chickens immunized with ricin and botulinum toxins over a two-year period. *Poultry Science* 88:281-290
- Pediatric Database. 1994. Congenital Toxoplasmosis. <http://www.icondata.com/health/pedbase/files/CONGEN14.HTM> diakses tanggal 1-2-2005 jam 07:00
- Que, X.C., A. Wuderlich, K.A. Joiner and S.L. Reed. 2004. Toxopain-1 is Critical for Infection in a Novel Chicken Embryo Model of Congenital Toxoplasmosis. *IAI*. 72(5):2915-2921
- Raghupathy R, 2001. Pregnancy: success and failure within the Th1/Th2/Th3 paradigm. *Semin. Immunol.* 13:219-227
- Suartha I.N., Wibawa I.W.T dan Darmono I.B.P. 2006. Produksi Imunoglobulin Y Spesifik Antitetanus Pada Ayam. *J.Vet.* 7 (1): 21-28
- Suwanti L.T. 1996. Identifikasi dan Produksi Antibodi Monoklonal Protein membran *Toxoplasma gondii* Stadium Takizoit. Tesis. Pascasarjana Universitas Gadjah mada Yogyakarta.

- Suwanti L.T. 2005. Mekanisme Peningkatan Apoptosis Trofoblas Mencit Terinfeksi *Toxoplasma gondii* Melalui Peningkatan Sel Desidua Penghasil IFN- $\gamma$  dan TNF- $\alpha$  serta Trofoblas Penghasil FAS dan TNFR-1. Disertasi. Pasca Sarjana Universitas Airlangga Surabaya.
- Suwanti L.T. 2006<sup>a</sup>. Peningkatan Apoptosis Trofoblas Mencit Terinfeksi *Toxoplasma gondii* pada Berbagai Umur Kebuntingan. *J. Biosains Pascasarjana* 8 (2): 70-74
- Suwanti L.T. 2006<sup>b</sup>. Respons Imun Seluler Plasenta terhadap Infeksi *Toxoplasma gondii* pada Berbagai Umur Kebuntingan Mencit (*Mus musculus*). *Media Kedokteran Hewan*, 22 (3):168-173
- Suwanti L.T. 2008. Peningkatan aktivitas Makrofag Desidua Mencit Bunting Yang diinfeksi *Toxoplasma gondii*. *Media Kedokteran Hewan*, 24 (1): 63-67
- Suwanti L.T, Sasmita R and Putra ST. 2006. *Toxoplasma gondii* Infection Elicits The Increase of Fas Expression on The Trophoblast Associated with The Increase of Trophoblast Apoptosis. *Folia Medica Indonesiana*, 42 (1): 3-7
- Suwanti L.T, Sasmita R, Suprihati E dan Hastutiek P.2008. Angka Penularan *Toxoplasma gondii* Kongenital pada Mencit Bunting yang Diinfeksi Isolat Lokal pada Umur Kebuntingan yang Berbeda. *Veterinaria Medika* 1(2): 109-112
- Suwanti L.T., 2009. Weight Reduction of Fetuses of *Toxoplasma gondii*-infected Mice. *Prosiding International Conference "Animal Health and Human Safety" UPM Malaysia*. pp 197-200
- Vercammen, M, T. Scorza, K. Huygen, J. De Braekeleer, R. Diet, D. Jacobs, E. Saman, and H. Verschueren 2000. DNA Vaccination with Genes Encoding *Toxoplasma gondii* Antigens GRA1, GRA7, and ROP2 Induces Partially Protective Immunity against Lethal Challenge in Mice *Infect. and Immun.*, 68 (1): 38-45.
- Webster N.L., Wee J., Uren S.J., Boyle W. and Sandrin M.S. 2005. Production and purification of human indoleamine 2,3-dioxygenase (HuIDO) protein in a baculovirus expression system and production and characterization of egg yolk antibody against the purified HuIDO. *Immunology and Cell Biology* 83: 542-548

## LAMPIRAN

## A. Mencit yang Mendapat Infeksi pada Umur 9,5 hari

## 1. Penghitungan Berat dan Jumlah Fetus

## Descriptives

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
Berat Fetus Mencit								
Kontrol negati	5	.3940	.06189	.02768	.3172	.4708	.33	.46
Kontrol Positif	5	.2000	.05431	.02429	.1326	.2674	.13	.26
Diimunisasi Ig ESA	5	.3040	.08204	.03669	.2021	.4059	.20	.39
Diimunisasi Ig Y	5	.3520	.05805	.02596	.2799	.4241	.26	.42
Membran								
Total	20	.3125	.09519	.02129	.2679	.3571	.13	.46
Jumlah Fetus Mencit								
Kontrol negati	5	17.60	5.899	2.638	10.28	24.92	13	25
Kontrol Positif	5	12.80	3.271	1.463	8.74	16.86	8	16
Diimunisasi Ig ESA	5	13.40	8.620	3.855	2.70	24.10	7	28
Diimunisasi Ig Y	5	16.00	5.831	2.608	8.76	23.24	12	26
Membran								
Total	20	14.95	6.030	1.348	12.13	17.77	7	28

## ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Berat Fetus Mencit	Between Groups	.105	3	.035	8.267	.002
	Within Groups	.068	16	.004		
	Total	.172	19			
Jumlah Fetus Mencit	Between Groups	75.750	3	25.250	.657	.590
	Within Groups	615.200	16	38.450		
	Total	690.950	19			

**Berat Fetus Mencit**Duncan<sup>a</sup>

Imunisasi	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
Kontrol Positif	5	.2000	
Diimunisasi Ig ESA	5		.3040
Diimunisasi Ig Y Membran	5		.3520
Kontrol negati	5		.3940
Sig.		1.000	.053

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 5,000.

**Jumlah Fetus Mencit**Duncan<sup>a</sup>

Imunisasi	N	Subset for alpha = 0.05
		1
Kontrol Positif	5	12.80
Diimunisasi Ig ESA	5	13.40
Diimunisasi Ig Y Membran	5	16.00
Kontrol negati	5	17.60
Sig.		.277

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 5,000.

## 2. Skor Kerusakan plasenta

### Descriptives

#### Skor Histopat Plasenta

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
Kontrol negati	5	.000	.0000	.0000	.000	.000	.0	.0
Kontrol Positif	5	1.800	.4472	.2000	1.245	2.355	1.0	2.0
Diimunisasi Ig ESA	5	1.200	.4472	.2000	.645	1.755	1.0	2.0
Diimunisasi Ig Y Membran	5	.600	.5477	.2449	-.080	1.280	.0	1.0
Total	20	.900	.7881	.1762	.531	1.269	.0	2.0

### Ranks

Imunisasi		N	Mean Rank
Skor Histopat Plasenta	Kontrol negati	5	4.00
	Kontrol Positif	5	16.70
	Diimunisasi Ig ESA	5	12.80
	Diimunisasi Ig Y Membran	5	8.50
	Total	20	

### Test Statistics<sup>a,b</sup>

	Skor Histopat Plasenta
Chi-Square	14.612
df	3
Asymp. Sig.	.002

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable: Imunisasi

### Ranks

Imunisasi		N	Mean Rank	Sum of Ranks
Skor Histopat Plasenta	Kontrol negati	5	4.00	20.00
	Diimunisasi Ig Y Membran	5	7.00	35.00
	Total	10		

**Test Statistics<sup>b</sup>**

	Skor Histopat Plasenta
Mann-Whitney U	5.000
Wilcoxon W	20.000
Z	-1.964
Asymp. Sig. (2-tailed)	.050
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.151 <sup>a</sup>

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: Imunisasi

**Ranks**

Imunisasi		N	Mean Rank	Sum of Ranks
Skor Histopat Plasenta	Kontrol Positif	5	7.00	35.00
	Dimunisasi Ig ESA	5	4.00	20.00
	Total	10		

**Test Statistics<sup>b</sup>**

	Skor Histopat Plasenta
Mann-Whitney U	5.000
Wilcoxon W	20.000
Z	-1.800
Asymp. Sig. (2-tailed)	.072
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.151 <sup>a</sup>

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: Imunisasi

**Ranks**

Imunisasi		N	Mean Rank	Sum of Ranks
Skor Histopat Plasenta	Kontrol Positif	5	7.70	38.50
	Dimunisasi Ig Y Membran	5	3.30	16.50
	Total	10		



**Test Statistics<sup>a</sup>**

	Skor Histopat Plasenta
Mann-Whitney U	1.500
Wilcoxon W	16.500
Z	-2.460
Asymp. Sig. (2-tailed)	.014
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.016 <sup>b</sup>

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: Imunisasi

**Ranks**

Imunisasi		N	Mean Rank	Sum of Ranks
Skor Histopat Plasenta	Dimunisasi Ig ESA	5	6.80	34.00
	Dimunisasi Ig Y Membran	5	4.20	21.00
Total		10		

**Test Statistics<sup>a</sup>**

	Skor Histopat Plasenta
Mann-Whitney U	6.000
Wilcoxon W	21.000
Z	-1.678
Asymp. Sig. (2-tailed)	.093
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.222 <sup>b</sup>

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: Imunisasi

### 3. Indeks Apoptosis

#### Descriptives

Indeks Apoptosis Plasenta

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
Kontrol negati	5	7.3420	1.79564	.80303	5.1124	9.5716	4.61	8.70
Kontrol Positif	5	34.3060	6.03947	2.70093	26.8070	41.8050	26.90	40.80
Diimunisasi Ig ESA	5	15.3720	4.69687	2.10051	9.5401	21.2039	12.33	23.61
Diimunisasi Ig Y Membran	5	14.6680	3.44604	1.54112	10.3892	18.9468	12.33	20.66
Total	20	17.9220	10.95891	2.45049	12.7931	23.0509	4.61	40.80

**ANOVA**

Indeks Apoptosis Plasenta

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1987.314	3	662.438	35.985	.000
Within Groups	294.541	16	18.409		
Total	2281.856	19			

**Indeks Apoptosis Plasenta**

Duncan<sup>a</sup>

Imunisasi	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
Kontrol negati	5	7.3420		
Diimunisasi Ig Y Membran	5		14.6680	
Diimunisasi Ig ESA	5		15.3720	
Kontrol Positif	5			34.3060
Sig.		1.000	.799	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 5,000.

**4. Lama Menunjukkan Gejala, Hidup, Abortus dan Angka Penularan**

**Descriptives**

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
Lama waktu Kontrol Positif	5	5.0000	.00000	.00000	5.0000	5.0000	5.00	5.00

gejala klinis mulai nampak	Diimunisasi Ig ESA	5	6.0000	.00000	.00000	6.0000	6.0000	6.00	6.00
	Diimunisasi Ig Y	5	6.0000	.00000	.00000	6.0000	6.0000	6.00	6.00
	Membran								
	Total	15	5.6667	.48795	.12599	5.3964	5.9369	5.00	6.00
lama Waktu Induk bertahan Hidup	Kontrol Positif	5	7.0000	.00000	.00000	7.0000	7.0000	7.00	7.00
	Diimunisasi Ig ESA	5	7.6000	.41833	.18708	7.0806	8.1194	7.00	8.00
	Diimunisasi Ig Y	5	7.7000	.27386	.12247	7.3600	8.0400	7.50	8.00
	Membran								
Total	15	7.4333	.41690	.10764	7.2025	7.6642	7.00	8.00	
Mulai Mencit menunjukkan gejala Abortus	Kontrol Positif	5	6.2000	.44721	.20000	5.6447	6.7553	6.00	7.00
	Diimunisasi Ig ESA	5	7.2000	.27386	.12247	6.8600	7.5400	7.00	7.50
	Diimunisasi Ig Y	5	7.4000	.41833	.18708	6.8806	7.9194	7.00	8.00
	Membran								
Total	15	6.9333	.65101	.16809	6.5728	7.2938	6.00	8.00	
Angka Penularan pada Anak	Kontrol Positif	4	37.590	5.51353	2.7567	28.8167	46.3633	30.00	42.86
			0		7				
	Diimunisasi Ig ESA	5	26.960	4.74322	2.1212	21.0705	32.8495	23.08	33.33
			0		3				
	Diimunisasi Ig Y	5	28.374	6.10513	2.7303	20.7935	35.9545	20.00	35.71
Membran		0		0					
Total	14	30.502	6.88705	1.8406	26.5257	34.4786	20.00	42.86	
		1		4					

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Lama waktu gejala klinis mulai nampak	Between Groups	3.333	2	1.667		
	Within Groups	.000	12	.000		
	Total	3.333	14			
lama Waktu Induk bertahan Hidup	Between Groups	1.433	2	.717	8.600	.005
	Within Groups	1.000	12	.083		
	Total	2.433	14			
Mulai Mencit menunjukkan gejala Abortus	Between Groups	4.133	2	2.067	13.778	.001
	Within Groups	1.800	12	.150		
	Total	5.933	14			
Angka Penularan pada Anak	Between Groups	286.330	2	143.165	4.768	.032
	Within Groups	330.280	11	30.025		

**ANOVA**

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Lama waktu gejala klinis mulai nampak	Between Groups	3.333	2	1.667		
	Within Groups	.000	12	.000		
	Total	3.333	14			
lama Waktu Induk bertahan Hidup	Between Groups	1.433	2	.717	8.600	.005
	Within Groups	1.000	12	.083		
	Total	2.433	14			
Mulai Mencit menunjukkan gejala Abortus	Between Groups	4.133	2	2.067	13.778	.001
	Within Groups	1.800	12	.150		
	Total	5.933	14			
Angka Penularan pada Anak	Between Groups	286.330	2	143.165	4.768	.032
	Within Groups	330.280	11	30.025		
	Total	616.610	13			

**lama Waktu Induk bertahan Hidup**

Duncan<sup>a</sup>

Imunisasi	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
Kontrol Positif	5	7.0000	
Diimunisasi Ig ESA	5		7.6000
Diimunisasi Ig Y Membran	5		7.7000
Sig.		1.000	.594

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 5,000.

**Mulai Mencit menunjukkan gejala Abortus**

Duncan<sup>a</sup>

Imunisasi	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
Kontrol Positif	5	6.2000	
Diimunisasi Ig ESA	5		7.2000
Diimunisasi Ig Y Membran	5		7.4000

Sig.		1.000	.430
------	--	-------	------

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 5,000.

**Angka Penularan pada Anak**

Duncan<sup>a,b</sup>

Imunisasi	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
Diimunisasi Ig ESA	5	26.9600	
Diimunisasi Ig Y Membran	5	28.3740	
Kontrol Positif	4		37.5900
Sig.		.703	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 4,615.

b. The group sizes are unequal. The harmonic mean of the group sizes is used. Type I error levels are not guaranteed.

**B. Mencit yang Mendapat Infeksi pada Umur 14,5 hari**

**1. Penghitungan Berat dan Jumlah Fetus**

**Descriptives**

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
Jumlah Fetus Mencit								
Kontrol negati	5	10.20	1.483	.683	8.36	12.04	8	12
Kontrol Positif	5	10.20	1.095	.490	8.84	11.56	9	11
Diimunisasi Ig ESA	5	11.40	1.140	.510	9.98	12.82	10	13
Diimunisasi Ig Y Membran	5	10.20	2.280	1.020	7.37	13.03	7	13
Total	20	10.50	1.539	.344	9.78	11.22	7	13
Berat Fetus								
Kontrol negati	5	.8960	.23082	.1032	.6094	1.1826	.71	1.19

Mencit	Kontrol Positif	5	.8500	.22293	.0997 0	.5732	1.1268	.66	1.22
	Diimunisasi Ig ESA	5	.9340	.08620	.0385 5	.8270	1.0410	.84	1.01
	Diimunisasi Ig Y Membran	5	1.0980	.18873	.0844 0	.8637	1.3323	.81	1.34
	Total	20	.9445	.19985	.0446 9	.8510	1.0380	.66	1.34

**ANOVA**

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Jumlah Fetus Mencit	Between Groups	5.400	3	1.800	.727	.551
	Within Groups	39.600	16	2.475		
	Total	45.000	19			
Berat Fetus Mencit	Between Groups	.175	3	.058	1.596	.230
	Within Groups	.584	16	.037		
	Total	.759	19			

**2. Skor Kerusakan plasenta**

**Descriptives**

Skor Histopat Plasenta

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
Kontrol negati	5	2.400	.5477	.2449	1.720	3.080	2.0	3.0
Kontrol Positif	5	3.400	.5477	.2449	2.720	4.080	3.0	4.0
Diimunisasi Ig ESA	5	3.200	.4472	.2000	2.645	3.755	3.0	4.0
Diimunisasi Ig Y Membran	5	2.400	.5477	.2449	1.720	3.080	2.0	3.0
Total	20	2.850	.6708	.1500	2.536	3.164	2.0	4.0

**Ranks**

Imunisasi		N	Mean Rank
Skor Histopat Plasenta	Kontrol negati	5	6.90

Kontrol Positif	5	14.80
Dimunisasi Ig ESA	5	13.40
Dimunisasi Ig Y Membran	5	6.90
Total	20	

**Test Statistics<sup>a,b</sup>**

	Skor Histopat Plasenta
Chi-Square	9.370
Df	3
Asymp. Sig.	.025

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable: Imunisasi

**Ranks**

Imunisasi		N	Mean Rank	Sum of Ranks
Skor Histopat Plasenta	Kontrol Positif	5	6.00	30.00
	Dimunisasi Ig ESA	5	5.00	25.00
	Total	10		

**Test Statistics<sup>a</sup>**

	Skor Histopat Plasenta
Mann-Whitney U	10.000
Wilcoxon W	25.000
Z	-.655
Asymp. Sig. (2-tailed)	.513
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.690 <sup>a</sup>

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: Imunisasi

**Ranks**

Imunisasi	N	Mean Rank	Sum of Ranks
-----------	---	-----------	--------------

Skor Histopat Plasenta	Diimunisasi Ig ESA	5	7.20	36.00
	Diimunisasi Ig Y Membran	5	3.80	19.00
	Total	10		

**Test Statistics<sup>b</sup>**

	Skor Histopat Plasenta
Mann-Whitney U	4.000
Wilcoxon W	19.000
Z	-2.032
Asymp. Sig. (2-tailed)	.042
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.095 <sup>a</sup>

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: Imunisasi

**3. Indeks Apoptosis**

**Descriptives**

**Indeks Apoptosis Plasenta**

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
Kontrol negati	5	33.4120	2.80318	1.11946	30.3039	36.5201	30.33	37.00
Kontrol Positif	5	36.7440	5.95161	2.66164	29.3541	44.1339	27.78	44.39
Diimunisasi Ig ESA	5	34.6800	3.81840	1.70764	29.9388	39.4212	28.06	37.78
Diimunisasi Ig Y Membran	5	33.0220	.86451	.38662	31.9486	34.0954	31.94	34.11
Total	20	34.4645	3.77119	.84326	32.6995	36.2295	27.78	44.39

**ANOVA**

**Indeks Apoptosis Plasenta**

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	42.156	3	14.052	.966	.424



Within Groups	228.060	16	14.254		
Total	270.216	19			

**4. Lama Menunjukan Gejala, Hidup, Berat Lahir, Jumlah lahir dan Angka Penularan**

**Descriptives**

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum	
					Lower Bound	Upper Bound			
Lama waktu gejala klinis mulai nampak	Kontrol Positif	5	6.4000	.54772	.24495	5.7199	7.0801	6.00	7.00
	Diimunisasi Ig ESA	5	6.6000	.54772	.24495	5.9199	7.2801	6.00	7.00
	Diimunisasi Ig Y Membran	5	7.0000	1.00000	.44721	5.7583	8.2417	6.00	8.00
	Total	15	6.6667	.72375	.18687	6.2659	7.0675	6.00	8.00
Lama Waktu Induk bertahan Hidup	Kontrol Positif	5	8.4000	.54772	.24495	7.7199	9.0801	8.00	9.00
	Diimunisasi Ig ESA	5	8.6000	.54772	.24495	7.9199	9.2801	8.00	9.00
	Diimunisasi Ig Y Membran	5	9.0000	1.00000	.44721	7.7583	10.2417	8.00	10.00
	Total	15	8.6667	.72375	.18687	8.2659	9.0675	8.00	10.00
Mulai Mencit menunjukkan gejala Abortus	Kontrol Positif	2	4.0000	.00000	.00000	4.0000	4.0000	4.00	4.00
	Diimunisasi Ig ESA	1	4.0000					4.00	4.00
	Diimunisasi Ig Y Membran	2	4.0000	.00000	.00000	4.0000	4.0000	4.00	4.00
	Total	5	4.0000	.00000	.00000	4.0000	4.0000	4.00	4.00
Angka Penularan pada Anak	Kontrol Positif	5	39.3100	5.83124	2.60781	32.0696	46.5504	33.33	45.45
	Diimunisasi Ig ESA	5	37.4040	4.17467	1.86691	32.2205	42.5875	33.33	42.86
	Diimunisasi Ig Y Membran	5	37.3800	7.95789	3.55881	27.4990	47.2610	28.57	50.00
	Total	15	38.0313	5.80210	1.49801	34.8182	41.2444	28.57	50.00
Jumlah Anak	Kontrol Positif	5	9.6000	.89443	.40000	8.4894	10.7106	9.00	11.00

yang dilahirkan	Diimunisasi Ig ESA	5	9.2000	1.92354	.86023	6.8116	11.5884	7.00	12.00
	Diimunisasi Ig Y	5	8.0000	.70711	.31623	7.1220	8.8780	7.00	9.00
	Membran								
	Total	15	8.9333	1.38701	.35813	8.1652	9.7014	7.00	12.00
BeratLahir	Kontrol Positif	5	1.3960	.06189	.02768	1.3192	1.4728	1.35	1.50
	Diimunisasi Ig ESA	5	1.3380	.08701	.03891	1.2300	1.4460	1.27	1.49
	Diimunisasi Ig Y	5	1.4900	.18908	.08456	1.2552	1.7248	1.27	1.67
	Membran								
Total	15	1.4080	.13294	.03433	1.3344	1.4816	1.27	1.67	

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Lama waktu gejala klinis mulai nampak	Between Groups	.933	2	.467	.875	.442
	Within Groups	6.400	12	.533		
	Total	7.333	14			
lama Waktu Induk bertahan Hidup	Between Groups	.933	2	.467	.875	.442
	Within Groups	6.400	12	.533		
	Total	7.333	14			
Mulai Mencit menunjukkan gejala Abortus	Between Groups	.000	2	.000		
	Within Groups	.000	2	.000		
	Total	.000	4			
Angka Penularan pada Anak	Between Groups	12.264	2	6.132	.160	.854
	Within Groups	459.037	12	38.253		
	Total	471.300	14			

Descriptives

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
jumlah Anak yang dilahirkan	5	8.6000	1.51658	.67823	6.7169	10.4831	7.00	11.00
Kontrol negati	5	9.6000	.89443	.40000	8.4894	10.7106	9.00	11.00
Kontrol Positif	5	9.2000	1.92354	.86023	6.8116	11.5884	7.00	12.00
Diimunisasi Ig ESA								

	Diimunisasi Ig Y Membran	5	8.0000	.70711	.31623	7.1220	8.8780	7.00	9.00
	Total	20	8.8500	1.38697	.31014	8.2009	9.4991	7.00	12.00
BeratLahir	Kontrol negatif	5	1.4900	.12884	.05762	1.3300	1.6500	1.29	1.65
	Kontrol Positif	5	1.3980	.06189	.02768	1.3192	1.4728	1.35	1.50
	Diimunisasi Ig ESA	5	1.3380	.08701	.03891	1.2300	1.4480	1.27	1.49
	Diimunisasi Ig Y Membran	5	1.4900	.18908	.08456	1.2552	1.7248	1.27	1.67
	Total	20	1.4286	.13359	.02987	1.3680	1.4910	1.27	1.67

## ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
jumlah Anak yang dilahirkan	Between Groups	7.350	3	2.450	1.342	.296
	Within Groups	29.200	16	1.825		
	Total	36.550	19			
BeratLahir	Between Groups	.084	3	.028	1.758	.196
	Within Groups	.255	16	.016		
	Total	.339	19			