

01
01/06/2005
047
1

DISERTASI

PENGARUH INFEKSI TOXOPLASMA PADA HASIL KEHAMILAN MELALUI INTERFERON GAMA (IFN- γ), CASPASE-3 DAN APOPTOSIS SEL-SEL PLASENTA

PENELITIAN EKSPERIMENTAL LABORATORIS
PADA MENCIT BALB/c BUNTING YANG DIINOKULASI DENGAN TAKHIZOIT
TOXOPLASMA GONDII GALUR RH

REKOR
PERPUSTAKAAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA



TEGUH WAHJU SARDJONO

PROGRAM PASCASARJANA
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2005

**PENGARUH INFEKSI TOXOPLASMA PADA HASIL KEHAMILAN
MELALUI INTERFERON GAMA (IFN- γ), CASPASE-3 DAN
APOPTOSIS SEL-SEL PLASENTA**

**PENELITIAN EKSPERIMENTAL LABORATORIS
PADA MENCIT BALAB BUNTING YANG DIINOKULASI DENGAN TROPHOZOIT
TOXOPLASMA GONDII GALUR RH**

DISERTASI

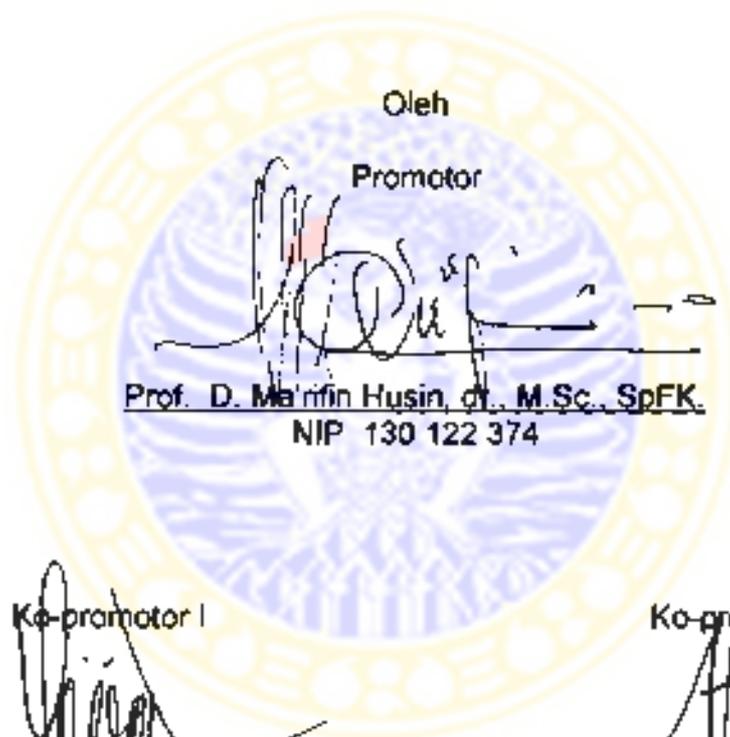
Untuk memperoleh Gelar Doktor
dalam Program Studi Ilmu Kedokteran
Pada Program Pascasarjana Universitas Airlangga
Telah dipertahankan di hadapan
Panitia Ujian Doktor Terbuka
Pada hari : Selasa
Tanggal : 22 Maret 2005
Pukul 10.00 WIB

Oleh :

TEGUH WAHJU BARDJONO
NIM. 009813106

LEMBAR PENGESAHAN

DISERTASI INI TELAH DISETUJUI
TANGGAL 13 MEI 2005



Oleh

Promotor


Prof. D. Marifin Husin, dr., M.Sc., SpFK.
NIP 130 122 374

Ko-promotor I


Prof. Dr. Yoes Priatna Dachlan, dr., M.Sc., SpParK.
NIP 130 359 278

Ko-promotor II


Prof. Achmad Hidayat, dr., SpOG(K).
NIP 130 261 143

Telah diuji pada Ujian Tahap I (Tertutup)
Tanggal 12 FEBRUARI 2005

PANITIA PENGUJI DISERTASI TAHAP I

Ketua Prof H R Hariadi, dr., SpOG(K)

Anggota

- 1 Prof D. Mairifin Husin, dr., MSc., SpFK
- 2 Prof Dr Yoes Prjatna Dachlan, dr. M.Sc., SpPark
- 3 Prof Achmad Hidayat, dr., SpOG(K).
- 4 Prof H R Wasito, drh , MSc., PhD.
5. Dr. Watadianta, dr., MS., SpPA.
- 6 Dr Solimun. Ir., MS.
- 7 Dr. Edi Widjajanto, dr., MS , SpPK(K)

Ditetapkan dengan Surat Keputusan
Rektor Universitas Airlangga
Nomor 1148 /JO3/PP/2005
Tanggal 22 Pebruari 2005

PANITIA PENGUJI DISERTASI TAHAP II

Tanggal 22 Maret 2005

- | | |
|---|------------------|
| 1 Prof. Dr. Mandoyo Rukmo, drg, M.Sc. Sp.KG | - Ketua Sidang |
| 2 Prof. D. Ma'rifin Husin, dr., MSc., SpFK. | - Promotor |
| 3 Prof. Dr. Yoes Prijatna Dachlan, dr., M.Sc., SpParK. | - Ko-promotor I |
| 4 Prof. Achmad Hidayat, dr., SpOG(K). | - Ko-promotor II |
| 5 Prof. Dr. Soegeng Soegijanto, dr., DTM&H, SpA(K) | - Penyanggah |
| 6 Prof. H. Sudarto, dr., DTM&H, PhD, SpParK. | - Penyanggah |
| 7 Prof. Dr. Sri Subekti Bendryman, drh. DEA | - Penyanggah |
| 8 Prof. Dr. Moersintowarti B. Narendra, dr., MSc., SpA(K) | - Penyanggah |
| 9 Prof. Dr. Ismoedjanto, dr., DTM&H., SpA(K) | - Penyanggah |
| 10 Prof. H. R. Hariadi, dr. SpOG(K) | - Penyanggah |

UCAPAN TERIMAKASIH

Alhamdulillah, segala puji dan syukur saya panjatkan ke hadirat Allah s w t Tuhan Semesta Alam. Yang Maha Pengasih dan Maha Penyayang, bahwa atas rahmat karunia dan ridlaNya yang dicurahkan kepada saya, akhirnya saya dapat menyelesaikan disertasi ini. Dari seluruh proses dan kejadian yang saya alami selama menempuh program pendidikan Doktor ini, saya kian sadar bahwa ilmu yang saya miliki hanyalah bagaikan setetes air di tengah samudera yang luas.

Rasa hormat, penghargaan serta terimakasih yang tak terhingga saya haturkan kepada Prof. D. Ma'nifn Husin, dr. MSc., SpFK., guru besar dalam bidang Farmakologi, yang telah membimbing saya sejak sebagai penasehat akademik, kemudian menjadi Promotor sampai dengan selesainya disertasi ini. Beliau benar-benar telah menjadi 'orang tua' yang menghantarkan saya untuk memasuki dunia baru, yaitu masyarakat ilmiah yang belum pernah saya ketahui. Dari beliau saya mendapatkan berbagai hal yang tidak ternilai harganya; bukan saja berupa ilmu dan wawasan tugas serta tanggung jawab moral seorang ilmuwan, tetapi juga nilai-nilai luhur kehidupan yang selama ini tidak pernah saya ketahui, saya sadari maupun saya pikirkan. Beliau selalu menyediakan waktu di saat-saat kritis, ketika kondisi saya sedang goyah, semangat sedang menurun, otak tidak mau diajak berpikir dan di kala menjumpai masalah-masalah yang tidak terpecahkan. Semoga Allah s w t senantiasa melimpahkan rahmat dan hidayahNya kepada beliau, memberikan karunia kesehatan dan mencatat segala amal beliau sebagai amal sholeh, serta melipat gandakan pahalaNya. Amin

Terimakasih yang tak terhingga juga saya sampaikan kepada Prof. Dr. Yoes Prijatna Dachlan, dr., MSc., SpParK, guru besar bidang Parasitologi dan Immunologi, selaku Ko-Promotor I. Beliau juga telah membimbing saya dan membenarkan serta masukan ide-ide baru yang sangat berharga dalam substansi ilmu yang saya kaji khususnya di bidang immunologi penyakit-parasit, sejak saya mulai menyusun proposal sampai dengan selesainya disertasi ini.

Terimakasih dan penghargaan yang setinggi-tingginya saya sampaikan kepada Prof. Achmad Hidayat, dr., SpOG (K), guru besar di bidang Obstetri dan Ginekologi, selaku Ko-Promotor II. Beliau yang telah mendorong saya untuk membongkar "tembok penghalang" antara ilmu-ilmu pre-/para-klinik dengan ilmu-

ilmu klinik, khususnya di lingkungan Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Ketika menjabat Dekan, beliau bersama Djoko W. Soeatmadji, dr., SpPD., KEMD., selaku Kepala Laboratorium/UPF Ilmu Penyakit Dalam FKUB /RSSA, telah memberi izin kepada saya untuk belajar dan bekerja di cabang ilmu klinik sebagai residen/PPDS-IPD. Hal ini adalah prasyarat bagi saya untuk mengikuti pendidikan program *Master on Clinical Tropical Medicine* di Mahidol University Bangkok, Thailand. Beliau juga telah membukakan pintu bagi saya untuk masuk ke bidang Obstetri, guna meneliti hubungan antara toksoplasmosis dengan fenomena bayi cacat dan kejadian abortus pada manusia. Beliau telah membuat saya tegar menghadapi berbagai tantangan di klinik selama beberapa tahun, sampai akhirnya saya harus beralih ke hewan coba. Semoga semua yang telah dibenarkan oleh beliau kepada saya, membawa manfaat bagi semua pihak, dan membuka nuansa serta iklim ilmiah yang baru, khususnya di Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya dan Rumah Sakit dr. Saiful Anwar Malang. Semoga Allah s.w.t. memberikan balasan dengan pahala yang berlipat ganda. Amin.

Dengan telah selesainya disertasi ini, perkenankanlah saya mengucapkan terimakasih yang sebesar-besarnya kepada:

Rektor Universitas Airlangga Prof. Dr. Med. H. Puruhito, dr., SpBTKV, serta mantan Rektor Prof. H. Soedarto, dr., DTM&H, PhD., yang telah memberi kesempatan kepada saya mengikuti Program Doktor di Universitas Airlangga

Direktur Program Pascasarjana Universitas Airlangga, Prof. Dr. H. Moh. Amin, dr., SpP, dan mantan Direktur Program Pascasarjana Universitas Airlangga Prof. Dr. Soedijono, dr., SpTHT., yang telah memberikan kesempatan kepada saya untuk mengikuti pendidikan Program Doktor di Universitas Airlangga.

Prof. Dr. Hj. Juliati Hood Atsegaff, dr., MS., SpPA, FIAC., mantan Ketua Program Studi dan Prof. Dr. Mandojo Rukmo, drg., MSc., SpKG., Ketua Program Studi Ilmu Kedokteran Program Pascasarjana Universitas Airlangga, atas pengarahan, nasehat dan dorongan yang diberikan selama saya menempuh Program Doktor ini.

Rektor Universitas Brawijaya, Prof. Dr. H. Bambang Guritno, Ir. dan mantan Rektor Universitas Brawijaya Prof. Dr. H. Eka Afran Troena, SE, atas izin dan dorongan semangat yang diberikan selama saya menempuh Program Doktor di Universitas Airlangga

Kepada Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya (FKUB), H. Hariyanto, dr.,MSPH., dan mantan Dekan FKUB, Achmad Rudiyanto, dr., SpPD.,KEMD, Pembantu Dekan I Prof Dr Muljohadi Ali, dr.,MS,SpFK, dan mantan Pembantu Dekan I Hj Hariyah Merdeka Mahdi, dr., SpM., Pembantu Dekan II H Samsul Islam, dr., SpMK, MKes., dan Pembantu Dekan III H. Sri Poeranto, dr.,MKes.,SpParK., saya ucapkan terimakasih atas kesempatan dan dorongan serta bantuan dana SPP selama 6 semester terakhir ini.

Kepada Kepala Laboratorium Parasitologi FKUB, Sudjari, dr.DTM&H, MSc SpParK, saya ucapkan terimakasih atas pengertian dan kesempatan yang diberikan kepada saya untuk meninggalkan sebagian besar tugas-tugas pokok rutin di Laboratorium. selama saya menempuh Program Doktor ini

Ungkapan rasa terimakasih saya sampaikan kepada para dosen saya di Program Pascasarjana Universitas Airlangga. Prof Purnomo Sunjohudojo, dr.; Prof. Bambang Rahino Setokoesoemo, dr.; Prof. Dr.P.G.Konthen.dr.,SpPD; Prof. Eddy Pranowo Soedibyo.dr.,MPH.(alm).,Prof Soetandyo Wignjosoebroto, MPA, Prof Dr Koento Wibisono Siswomihardjo.; Prof. Dr. H.J.Glinka, SVD.; Prof. Dr. A. Zainuddin, Drs. Apt... Prof. Dr. Samanu, drh., MS... Prof. Dr. Suhartono Taat Putra, dr, MS.; Widodo J.Pudjirahardjo, dr., MS, MPH., DrPH.; Dr. FM Yudayana dr., MS.; Dr.Inwan Setiabudi, dr., SpPK.; Siti Pariant, dr., MPH, PhD; Dr L Dison Drs., MA, Prof. Dr. Kuntoro, dr., MPH, dan H. Fuad Amsyari, dr., MPH., PhD., dan para dosen Mata Kuliah Penunjang Disertasi dan penguji proposal penelitian, Prof H. R. Hariadi, dr SpOG (K); Prof. D. Ma'rifin Husin, dr., SpFK.; Prof. Dr Yoes Priyatna Dachlan.dr.,MSc SpParK; Prof. Dr.Rochiman Sasmita, drh, MS.; Prof H.R. Wasito, drh, MSc, PhD.. Prof. Sugeng Sukanto,dr, SpPA., PhD. (alm) dan Prof. Sutiman Bambang Sumitro, Drs, SU, DSc; yang telah menambah wawasan saya di bidang keilmuan dan kepakaran beliau masing-masing.

Ucapan terimakasih juga saya sampaikan kepada teman-teman sejawat di Pusat Veterinaria Farma Wonocolo, Andre Heryanto, drh., Imam Suryanto, drh., MKes., yang telah membantu saya sejak mencari isolat *Toxoplasma gondii* galur lokal dari kucing-kucing liar dari pasar dan TPA, sampai dengan penyediaan hewan coba mencit yang saya gunakan dalam peneltian disertasi ini. Mudah-mudahan usaha kita bersama yang sampai saat ini belum tercapai dapat kita lanjutkan setelah saya menyelesaikan disertasi ini.

Ungkapan terimakasih yang tak terhingga saya sampaikan kepada Ketua Pusat Studi Bioteknologi Universitas Gajah Mada, Prof. Abdul Salam M.Sofro, dr PhD, dan Dr. I Wayan T Artama, drh, yang telah memberi kesempatan kepada saya untuk bekerja, mendapatkan isolat *Toxoplasma gondii* dan menggunakan fasilitas laboratorium, sehingga penelitian saya dapat terlaksana. Juga kepada para teknisi di Laboratorium Pusat Studi Bioteknologi Universitas Gajah Mada, pak Tukjo, mbak Arsyah dan teman-teman, yang telah membantu saya sejak dan pemeliharaan mencit sampai dengan perlakuan, pengambilan, pemeriksaan dan pembuangan sisa bahan penelitian, saya ucapkan terimakasih. Juga kepada sejawat Sn Murwani drh, MP. dari Laboratorium Mikrobiologi FKUB yang telah membantu menunjukkan jalan kepada saya sehingga saya dapat bekerja di PAU-UGM, dan para mahasiswa bimbingan saya Menik, Emma, Angel dan Niken yang telah membantu saya, saya ucapkan terimakasih.

Kepada Dr. Solimun, Ir., MS. yang dengan sabar menuntun, membantu dan membenarkan masukan sejak saat membuat rancangan penelitian sampai dengan melakukan analisis data, saya ucapkan banyak terimakasih

Kepada kepala laboratorium Biomedik FKUB Dr. Sumarno, dr. DMM. SpMK beserta seluruh staf dan karyawan di laboratorium Biomedik FKUB, Dr. I Ketut G. Muliarta, dr. SpPA, Sdr. Wibi Riawan, Ssi., mbak Afrida dan mbak Ucik yang telah membantu saya mulai dari pengecatan sediaan imunohistokimia sampai dengan pembacaan dan penghitungan sel-sel, saya ucapkan terimakasih. Juga kepada para sejawat di Laboratorium Patologi Anatomi terutama Mudji Wiyono HE, dr. MS, SpPA; E. Norahmawati, dr. SpPA. yang telah sangat membantu saya dalam identifikasi dan penghitungan sel, saya ucapkan terimakasih.

Kepada Prof. Sutiman Bambang Sumitro, Drs., SU., DSc. yang telah memberi kesempatan kepada saya untuk menggunakan mikroskop di ruang khusus beliau sehingga saya dapat membuat dokumentasi foto-foto sediaan yang diperiksa, juga kepada Dr. Aulanni'am, drh., DES. yang telah menemani dan memperkenalkan saya dengan dunia biomolekuler terutama PCR sejak awal penelitian tentang *Toxoplasma* (tahun 1996), saya ucapkan terimakasih.

Kepada guru-guru saya sejak Taman Kanak-kanak di Tuban, SD Tegalloji SMP Negeri dan SMA Negeri di Banyuwangi, serta para dosen saya di Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga Surabaya dan di *Faculty of Tropical Medicine*

Mahidol University Bangkok Thailand, saya sampaikan terimakasih dan penghargaan yang tak terhingga atas bekal ilmu yang telah diberikan sehingga saya menjadi dokter, master dan mengikuti pendidikan Program Doktor ini.

Tenmakasih yang tak terhingga juga saya sampaikan kepada Prof. Dr. Sri Oemijati, dr. SpPark, guru besar dan konsultan WHO dalam bidang Parasitologi, yang telah menganggap saya sebagai cucu dan selalu memberi motivasi serta dorongan kepada saya untuk terus belajar, sejak saya mengikuti pendidikan lanjutan di Mahidol University, sampai dengan jenjang yang tertinggi. Semoga dengan selesainya disertasi ini, saya dapat memenuhi harapan beliau tersebut.

Kepada teman-teman G-15: Dr.H.M. Soemarmo, dr. SpB-KBD, Dr.H. Respati Suryanto Drajat, dr. SpOT, Dr. H. Sananto Santoso, dr. DTM&H, SpMK, Prof. Dr. H. Mohamad Hidayat, dr. SpOT, FICS, Dr. H. Noorhamdani AS, dr., DMM, SpMK, Dr. H. Djoni Djunaedi, dr. SpPD KTI; Dr. H.M. Istiadjud ES, dr., SpS, SpBS, Dr. H. Abryoso dr. SpP(K), Dr. H. Bambang Pardjianto, dr. SpB, SpBP, HMS Chandra Kusuma, dr. SpA(K), Nannerd Hutaryo Suhadi, dr., SpM, H. Hari Bagianto, dr. SpAn, KIC., H. Achdiat Agoes, dr. SpS, dan H. Mardhani YS, dr. SpA., saya ucapkan terimakasih atas kebersamaan yang telah kita jalin selama ini. Semoga kebersamaan ini dapat terus kita jaga dan kita bina untuk selamanya.

Kepada senior dan teman sejawat di Laboratorium Parasitologi FKUB, Prof. Hj. Soebaktuningsih, dr. DTM&H, MSc SpPark; H. Aswin D. Baskoro, dr. MS SpPark; Sudjari, dr. DTM&H, MSi, SpPark; Soesiati Rahajoe, dr.; Sn Poeranto, dr., MKes, SpPark; Dr. Hj. Loeki Enggar Fitri, dr., MKes., SpPark.; Mahono Widayat, dr., DAPE, MKes.; Agustina Tri Endarti, Ssi, dan Agustin Iskandar, dr., saya ucapkan terimakasih yang sebesar-besarnya atas pengertian dan bantuan semangat serta dorongan moral yang dibenkan kepada saya, sehingga saya dapat menyelesaikan pendidikan program Doktor ini.

Kepada sejawat Gatoet Ismanoe, dr., SpPD., KTI, yang telah menemani dan mengajak saya untuk membina kegiatan Penelitian tentang Penyakit-penyakit Tropik dan Infeksi di Matang, saya ucapkan terimakasih. Semoga setelah selesai pendidikan Doktor saya ini kita dapat lebih meningkatkan kerjasama kita.

Kepada teman-teman dekat saya dari *Padepokan Dharmawangsa Dalam*, Dr. Edi Widjajanto, dr., MS, SpPK(K); Dr. Hj. Setyawati Karyono, dr., SpFK, dan H. Karyono Mintaroem, dr. SpPA, yang secara khusus dan pribadi telah membantu

saya mulai dari mencari kepustakaan sampai dengan memecahkan ide-ide baru, demikian juga teman-teman dari grup TOYIB, H.Pudjo Sanyoto, dr.MKes., H.Siswanto, dr.MSc, H. April Mustika Rachmat, dr. SpA, Sudjari, dr.,DTM&H.,Msi SpParK.; H. Hari Purnomo, dr.SpS. yang telah mengajak saya mengurangi stress, menghibur diri dengan kegiatannya, saya ucapkan terimakasih buaaanyak.

Rasa hormat, penghargaan dan terimakasih saya haturkan kepada kedua orang tua saya tercinta, ayahanda H.R.Mohamad Ilham Wanengsoedirdjo, dan almarhumah ibunda Hj. Oemi Zakiyah, yang telah melahirkan, membesarkan dan mendidik saya dengan penuh kesabaran dalam lingkungan keluarga yang sederhana, sehingga saya dapat menghargai dan mensyukuri semua nikmat karunia Allah s.w.t. ini. Semoga Allah s.w.t. selalu memberikan karunia laufiq dan hidayahNya sehingga dalam usia ayahanda yang sekarang sudah 89 tahun, beliau tetap istiqomah dalam menjalankan ibadah. Kepada almarhumah ibunda yang tidak sempat menyaksikan peristiwa ini semoga Allah s.w.t. memberikan tempat yang layak di sisinya. Kepada almarhum ayah mertua saya Drs. Darmo Mulyoatmodjo, dan ibu mertua saya Suparti, saya haturkan terimakasih atas segala perhatian yang diberikan kepada saya. Demikian juga kepada saudara-saudara saya sekandung beserta suami dan isterinya, Hj. Oemi Wahyu Herawati dan H.Yoeswono Riady, Ssi., H.R. Mohamad Teguh Wahjudi, dr, MS, SpFK dan Hj. Andriyati, dr. SpRM, Hj.Oemi Wahyu Handayani dan H.Drs. Soewanadi, MSi.; maupun saudara-saudara ipar saya beserta suami dan isterinya; Wiwik Widarty, SKM,MBA dan Ibnu Samsi MSc, Budi Sudarmanto Ir dan Eri Ameliah, Ery Pudyastuti. SPd dan Handiyoko Ir, Didik Wahyudi dan Venita, Sri Rahayu dan Freddy Winanto, SE, Ak; Widodo Pudyanto Ir dan Oryana Agustin W. dr. serta para keponakan saya; Rina, dr. dan Masrukin, dr., Dhiany S.Ked., Yeni dan Andil, saya ucapkan terimakasih atas perhatian serta dorongannya kepada saya.

Kepada yang tercinta isteri Hj.Lilik Yusalyani, Dra. Apt., dan anak-anak saya, Fitri, Nuri, Dian, Rizqi dan Rizal, hanya dua kata kunci yang ingin saya sampaikan kepada kalian semua, yaitu terimakasih dan maaf. Terimakasih atas segala perhatian dan pengorbanan kalian semua yang telah kalian berikan kepada saya. **Maafkan saya** bila selama saya menempuh pendidikan ini, banyak hal, harapan, kebutuhan dan kepentingan kalian yang sering terpaksa tertunda atau tidak terlaksana karena harus mendahulukan kepentingan saya. Semoga

dengan telah selesainya disertasi ini, saya benar-benar bisa menjadi suami dan ayah dari kalian semua seperti yang kalian harapkan. Semoga kita benar-benar dapat mewujudkan keluarga yang Sakinah, Mawaddah wa Rahmah wa Barakah, dan dapat selalu saling berwasiat dalam kebenaran dan kesabaran. AMIN.

Kepada "anak-anak" saya yang lain, Rini, Winda, Solikin, Yuni, Aqib, Siti dan Naning saya ucapkan terimakasih atas bantuan kalian menemani "ibu dan adik-adik" kalian, sebelum, selama maupun sesudah saya menempuh program pendidikan ini.

Kepada Direksi dan seluruh karyawan Rumah Sakit Islam Aisyiyah Malang saya ucapkan banyak terimakasih atas segala bantuan dan perhatian yang diberikan kepada saya dalam berbagai bentuk, sebelum, selama dan setelah saya menempuh program pendidikan Doktor ini. Semoga Allah s.w.t. senantiasa melimpahkan rahmat dan karuniaNya, dan RSIA tetap jaya. AMIN.

Kepada Bapak dan Ibu Drs. Mohammed Kamal, MSc., dan keluarga Ibu Tjitjek Pandji Sumonarto, saya ucapkan terimakasih atas fasilitas rumah tinggal yang khusus diberikan kepada saya selama berada di Jogjakarta, sehingga saya dapat menyelesaikan penelitian di PAU UGM, untuk disertasi ini.

Kepada Ibu Ny. Zaafri Ilyas beserta Pusat Koperasi Wanita Jawa Timur (Puskowanjati) yang telah memberi bantuan dana, Ibu Yana dari PT Unilever dan teman-teman sejawat PPDS OBGYN FKUB, yang telah membantu pelaksanaan penelitian pada ibu-ibu yang mengalami abortus, saya ucapkan terimakasih.

Yang terakhir, kepada semua pihak yang tidak dapat saya sebutkan satu dan telah membantu saya selama menempuh program pendidikan Program Doktor ini, dari lubuk hati saya yang paling dalam saya sampaikan terimakasih. Semoga Allah Yang Maha Pemurah membalas kebaikan bapak dan ibu semua dengan pahala yang berlipat ganda.

JAZAAKUMULLAHU KHOIRON KATSIIRA. AMIEN.

RINGKASAN

Pengaruh Infeksi *Toxoplasma* pada Hasil Kehamilan Melalui Interferon-gama (IFN γ), Aktivitas Caspase 3 dan Apoptosis Sel-sel Plasenta

Penelitian eksperimental laboratoris pada mencit BALB/c bunting yang diinokulasi dengan tachizoit *Toxoplasma gondii* galur RH

Teguh Wahyu Sardjono

Toksoplasmosis sering disebut sebagai salah satu penyebab terjadinya kegagalan kehamilan, dengan berbagai jenis manifestasi klinis seperti abortus, lahir prematur, IUGR, lahir mati dan lahir cacat (Kasper and Boothroyd, 1993; Remington, 1995; Denney, 1999). Prevalensi toksoplasmosis secara serologik pada berbagai populasi di dunia termasuk di Indonesia mencapai lebih dari 50% (Partono dan Cross, 1975; Samil, 1988; Decavelas, 1990; Allain, 1998; Jenum, 1998; Sardjono, 2001a), namun apakah toksoplasmosis memang menyebabkan kegagalan kehamilan dan bagaimana mekanisme terjadinya hal tersebut, sampai sekarang masih belum dapat dijelaskan dengan baik.

Telah diketahui bahwa selain status kekebalan hospes, tingkat virulensi parasit penyebab infeksi sangat menentukan manifestasi klinik yang timbul. Berbagai jenis galur *Toxoplasma gondii* dikenal mempunyai tingkat virulensi yang tinggi, menengah dan rendah (Evans, 1992; Roberts and Alexander, 1992; Dardé, 1996; Guo and Johnson, 1996; Jensen, 1998; Dubey, 1999; Kobayashi, 1999). Infeksi patogen intraseluler termasuk *Toxoplasma gondii*, memicu sekresi berbagai jenis sitokin proinflamasi (Th1) seperti TNF α , IL-12 dan IFN γ . Hal ini bertujuan untuk melawan patogen yang bersangkutan, dan berdampak protektif bagi hospes yang bersangkutan (Hyde, 1990; Kasper and Boothroyd, 1993; Kasper, 1998; Denney, 1999; Abbas, 2000). Tetapi, overproduksi IFN γ akibat infeksi *Toxoplasma gondii* galur RH, justru menginduksi *Fas-dependent apoptosis* sel-sel T pada *Peyer's patch* dan plasenta (Liesenfeld, 1997; Bliss, 1999; Denney, 1999; Mordue, 2001), dan menyebabkan rusaknya sel-sel hepar serta kematian mencit (Dardé, 1996; Guo and Johnson, 1996; Jensen, 1998).

Kehamilan adalah suatu fenomena fisiologik di mana konseptus pada hakekatnya merupakan parasit atau "semi-allograft". Secara imunologik, parasit ini sepatutnya mengalami reaksi penolakan dari tubuh ibu, tetapi kenyataannya kehamilan tetap berlangsung hingga bayi aterm. Kelahiran normal pada dasarnya adalah bentuk penolakan janin yang sebelumnya telah diterima, yang terjadi sesuai dengan program yang direncanakan. Kegagalan kehamilan adalah bentuk penolakan yang terjadi lebih dini. Dari semua kasus kegagalan kehamilan 25-40% di antaranya terjadi pasca implantasi (Klein & Remington, 1995; Norwitz, 2001). Fenomena penerimaan dan penolakan janin ini cukup menarik perhatian para ahli sejak lebih dari setengah abad yang lalu (Cunningham, 1997; Hilla, 1997; Beer and Kwak Kim, 1998; Bowen, 2001). Berbagai konsep yang diajukan, khususnya tentang keterlibatan plasenta dalam immuno-patogenesis terjadinya kegagalan kehamilan, masih diperdebatkan dan belum mencapai kesepakatan pendapat.

Apoptosis sel-sel plasenta adalah proses yang fisiologis. Pada kehamilan normal ditemukan apoptosis sel-sel desidua dan trofoblas yang meningkat seiring dengan usia kehamilan (Smith, 1997; Runic, 1998; Halperin, 2000). Derajat apoptosis sel-sel plasenta bayi aterm yang lahir spontan tidak berbeda dengan yang lahir melalui tindakan pembedahan caesar (Thiet, 2000). Apoptosis sel-sel desidua dan villi khorionik pada kasus-kasus abortus spontan lebih tinggi dibanding pada kehamilan normal (Kokawa, 1998a; Jerzak, 1999; Hirabayashi, 1999; Ejima, 2000; Oumsiyeh, 2000). Kegagalan kehamilan diduga terjadi karena adanya peningkatan apoptosis sel-sel plasenta yang melebihi keadaan normal. Peningkatan $IFN\gamma$ pada toksoplasmosis dapat meningkatkan apoptosis sel-sel plasenta melalui jalur ekstrinsik, yaitu melalui interaksi *receptor-ligand-FADD*, yang mengaktivasi *initiator* dan *effector caspases*, termasuk *caspase-3* (Thornberry, 1998; Cotran, 1999; Anonymous, 2003; Rowe and Chuang, 2004).

Penelitian eksperimental laboratorium ini dilakukan dengan menggunakan mencit BALB/c bunting sebagai hewan coba, dengan tujuan untuk mencari dan mempelajari mekanisme terjadinya kegagalan kehamilan akibat toksoplasmosis. Untuk mendapatkan sejumlah mencit bunting dalam waktu yang bersamaan, dilakukan sinkronisasi oestrus terhadap 80 ekor mencit BALB/c betina yang sudah pernah beranak dengan memanfaatkan fenomena *Lee Boot effect*, *Whitten effect* dan *Pheromomone effect*. (O'Brien and Holmes, 1993; Bailie, 2000).

Setelah dikawinkan secara monogami selama satu malam, mencit-mencit tersebut dibagi menjadi 4 kelompok dosis, masing-masing beranggota 20 ekor. Inokulasi dengan takhizoit *Toxoplasma gondii* galur RH dilakukan pada H-9 pasca kawin (p.k.) dengan tiga tingkatan dosis, yaitu dosis 10, 50 dan 100 takhizoit ditambah kelompok kontrol (dosis 0). Pengamatan untuk masing-masing kelompok dosis dilakukan pada H 12, H 14, H 16 dan H-18 p.k. Darah diambil dari sinus orbitalis sebelum mencit dimatikan dengan dislokasi servikal, lalu diukur kadar sitokin IFN γ plasma dengan metoda ELISA. Takhizoit dalam cairan peritoneum dihitung menggunakan kamar hitung Neubauer. Setelah dibedah, hasil kehamilan dinilai dengan menghitung jumlah janin pada kedua uterus pada masing-masing mencit. Dua lobus uterus yang berisi janin masing-masing diambil untuk dibuat sediaan histopatologi. Dari insan jaringan yang serial, salah satu diantaranya dilakukan pemeriksaan imunohisto-kimia untuk menilai ekspresi enzim caspase-3. Insan sediaan histopatologi yang lain, masing-masing diwarnai dengan HE dan pewarnaan imunohistokimia menggunakan Apoptag Kit, lalu dihitung indeks apoptosis sel-sel trofoblas dan desidua dengan mikroskop cahaya biasa pada 20 lapangan pandang dengan pembesaran 1000X.

Dari 80 ekor mencit yang dikawinkan secara berpasangan, ternyata yang berhasil bunting pada pengamatan secara fisik berjumlah 45 ekor (*pregnancy rate* = 56,25%), tetapi pada pengelompokan ulang berdasarkan jumlah mencit pada masing-masing kelompok dosis yang masih hidup sampai dengan jadwal pembedahan serta memenuhi kriteria masukan, hanya diperoleh 24 ekor mencit masing-masing 9 mencit dibedah pada H12 mewakili periode-2, dan 15 mencit dibedah pada H15-16 mewakili periode-3 dari kebuntingan.

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa infeksi *Toxoplasma gondii* galur RH pada mencit BALB/c bunting menurunkan jumlah janin. Pengaruh ini baru terlihat secara nyata pada pengamatan H15-16 p.k., atau 6-7 hari p.i. Hasil uji ANOVA dan analisis jalur (*Path Analysis*) menunjukkan bahwa hasil kebuntingan berupa jumlah janin dipengaruhi oleh lama infeksi (-0,269, $p=0,005$) kenaikan kadar IFN γ plasma (-0,377; $p=0,002$) dan peningkatan apoptosis sel-sel trofoblas (-0,718, $p=0,000$). Jumlah janin tidak dipengaruhi oleh dosis infeksi (-0,01, $p=0,904$) jumlah takhizoit (0,206 $p=0,114$) dan apoptosis sel-sel desidua (0,014, $p=0,809$). Kadar IFN γ plasma dipengaruhi oleh jumlah takhizoit (0,647, $p=0,00$), dan lama infeksi

(0,288; $p=0,01$), tetapi tidak dipengaruhi oleh dosis infeksi (0,023; $p=0,824$). Kenaikan kadar IFN γ plasma meningkatkan aktivitas caspase-3 (0,359; $p=0,01$) dan kemudian meningkatkan apoptosis pada sel-sel trofoblas (0,962; $p=0,00$), tetapi tidak berpengaruh langsung pada apoptosis sel-sel trofoblas (0,082; $p=0,232$). Kenaikan kadar IFN γ plasma tidak meningkatkan aktivitas caspase 3 (-0,028; $p=0,854$) dan apoptosis sel-sel desidua secara langsung (0,057; $p=0,504$) ataupun melalui caspase 3 (-0,028; $p=0,854$). Pada periode 3 kebuntingan mencit, indeks apoptosis sel-sel trofoblas lebih tinggi secara signifikan dibanding indeks apoptosis sel-sel desidua ($p < 0,05$). Peningkatan apoptosis sel-sel trofoblas menurunkan jumlah janin (-0,718; $p=0,00$) sedang apoptosis sel-sel desidua tidak berpengaruh terhadap jumlah janin (0,014; $p=0,809$).

Dan hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa infeksi *Toxoplasma* pada periode-1 dan lama berlangsungnya infeksi mempengaruhi hasil kebuntingan. Pengaruh toksoplasmosis pada hasil kebuntingan lebih banyak melalui mekanisme imunologis dan biokimiawi dibandingkan karena parasitnya sendiri. Peningkatan kadar IFN γ yang berlebihan akibat infeksi *Toxoplasma gondii* galur RH, menurunkan jumlah janin secara signifikan (-0,377; $p=0,002$). Hal ini sekaligus menunjukkan bahwa masih banyak mekanisme pada tingkat molekuler dan sel yang terjadi tetapi belum dapat dijelaskan dari hasil penelitian ini dan perlu diteliti lebih jauh. Penurunan jumlah janin akibat kenaikan kadar IFN γ plasma juga terjadi melalui jalur apoptosis sel-sel trofoblas secara ekstrinsik, yang didahului oleh peningkatan aktivitas enzim caspase-3. Penurunan jumlah janin akibat peningkatan kadar IFN γ yang dipicu oleh infeksi *Toxoplasma gondii* galur RH pada mencit BALB/c bunting, patut diduga terjadi melalui peran makrofag. Makrofag yang mengisi 10-30% populasi sel di jaringan desidua dan pada kebuntingan normal berperan melakukan regulasi apoptosis sel-sel trofoblas, akan teraktivasi dan mensekresi IFN γ lokal lebih banyak. Hal ini menyebabkan ketahanan sel-sel trofoblas terhadap Fas-mediated apoptosis menurun sehingga jumlah sel yang apoptosis semakin meningkat. Pada penelitian ini dapat disimpulkan bahwa kegagalan kehamilan pada toksoplasmosis lebih diprakarsai oleh pihak fetal dibanding pihak maternal.

SUMMARY

Influence of *Toxoplasma* Infection on Pregnancy Outcome through Gamma Interferon (IFN γ), Activation of Caspase 3 and Apoptosis of Placental Cells

A laboratory experimental study on pregnant BALB/c mice inoculated by tachyzoites of RH strain *Toxoplasma gondii*

Teguh Wahyu Sardjono

Toxoplasmosis has been claimed as a cause of pregnancy failure, which may manifest as abortion, preterm labor, IUGR, stillbirth or congenital malformation (Kasper and Boothroyd, 1993; Remington, 1995; Denney, 1999). Serological prevalence of toxoplasmosis in some populations in the world and in Indonesia as well, are more than 50% (Partono and Cross, 1975; Samri 1988; Decavaías, 1990; Allain, 1998; Jenum, 1998; Sardjono, 2001a). So far, whether toxoplasmosis is the real cause of pregnancy failure or not, and how the mechanism of that, remains unexplained well.

It is generally known that beside host immunological status, level of parasite virulence plays major part in clinical presentation, and therefore the dramatically different pathological outcome is not easily assessed. Many strains of *Toxoplasma gondii* have their own virulence level, those are high, medium and low virulent (Evans, 1992; Roberts and Alexander, 1992; Dardé, 1996; Guo and Johnson, 1996; Jensen, 1998; Dubey, 1999; Kobayashi, 1999). Production of Th1 (pro-inflammatory) cytokines such as TNF α , IL-12 and IFN γ due to *Toxoplasma* infection, led to kill the pathogen and control of infection, resulting protective effect to the host (Hyde, 1990; Kasper and Boothroyd, 1993; Kasper, 1998; Denney, 1999; Abbas, 2000). Overproduction of IFN γ following infection of RH strain of *Toxoplasma gondii* induces Fas-dependent apoptosis of Peyer's patch T cells and placenta (Liesenfeld 1997; Bliss, 1999; Denney, 1999; Mordue, 2001), extensive liver damage and causes of mice death (Dardé, 1996; Guo and Johnson, 1996; Jensen, 1998).

Pregnancy is a physiological phenomenon, where a *conceptus* that is actually a parasite or "semi-allograft" may survive in maternal environment and accepted by maternal immune system within a certain period. Normal delivery is a form of rejection reaction towards *conceptus* which formerly accepted, occurs according to the program. Rejection reaction occurs earlier than the program is the basic mechanism of pregnancy failure which may manifest as abortion, preterm labor, IUGR and still birth. The phenomenon of fetal acceptance and rejection, become an interesting object of research since more than a half decade (Cunningham *et al* 1997, Hilla 1997; Beer and Kwak Kim, 1998, Bowen, 2001). Many concepts have proposed in connection to the involvement of placenta in immuno-pathogenesis of pregnancy failure, are still debate.

Apoptosis of placental cells is a normal process, where there is an increasing apoptosis of deciduas and trophoblast cells related to gestational age (Smith 1997, Runic, 1998, Halperin, 2000). There is no difference between index apoptosis of placental cells of aterm fetus which spontaneously delivered and by Caesarean operation (Thiet, 2000). Apoptosis of chorionic villi and decidual cells in spontaneous abortion is higher than in normal pregnancy (Kokawa 1998a, Jerzak, 1999; Hirabayashi, 1999, Ejima, 2000; Qumsiyeh, 2000). Pregnancy failure is assumed to be caused by the increase apoptosis of placental cells, more than normal. Overproduction of IFN γ in *Toxoplasma* infection leads to apoptosis of placental cells via extrinsic pathway, where the receptor-ligand interaction (FADD activate initiator and effector caspases including caspase 3 (Thornberry, 1998; Cotran, 1999; Anonymous, 2003, Rowe and Chuang, 2004).

This experimental study was carried out using BALB/c mice as animal model, in order to learn the mechanism of pregnancy failure in toxoplasmosis. To get a number of pregnant mice simultaneously, we performed an oestrus synchronization on 80 female BALB/c mice, using a technique based on Lee Boot, Whitten and Pheromone effects. Mice were mated monogamously within one night, then divided into four groups with 20 members of each group according to dose of inoculant. Tachyzoites of RH strain *Toxoplasma gondii* are inoculated intraperitoneally on D9 post-mating (p.m.) in three different doses, those are 10, 50, 100 tachyzoites and PBS as control group. Observation of treatment effect each group was done by examining plasma IFN γ , counting number of tachyzoites in peritoneal fluids before

opening the abdomen of mice from each group, on D12, D14, D16 and D18 p.m. As the abdomen opened, number of litters is counted and two gestation lobes from each uterine corn of mice are taken to be made histological slides. Level of plasma $\text{IFN}\gamma$ s are examined by ELISA technique and tachyzoites are counted in Neubauer counting slide. Histological slides from each sample are stained by immunohistological staining using anti-rabbit caspase-3 antibody. Two slides of sample are each stained with haematoxylin-eosine and Apotag Kit, then examined and counted the apoptotic index of trophoblast and decidua cells under light microscope from 20 fields of 1000 magnifications.

Among 80 mice monogamously mated, there were 45 mice observed as physically pregnant (pregnancy rate = 56,25%) but after regrouping according to the number pregnant mice that still alive until the day of observation and fulfill inclusion criterias, there were only 9 mice sectioned on D12, represented second period and 15 mice sectioned on D15-16, represented third period of gestation respectively.

Result of study showed that infection of RH strain of *Toxoplasma gondii* in pregnancy decrease number of litters. Reduction number of litters related to dose and duration of infection just observed significantly at third period of pregnancy, or 6-7 days p.i. Mean difference, regression and path analysis showed that number of litters were only related to duration of infection (-0.269, $p=0.005$), level of plasma $\text{IFN}\gamma$, (-0.377, $p=0.002$) and trophoblast apoptotic index (-0.718; $p=0.000$). In contrast, number of litters were not related to dose of inoculation (-0.01, $p=0.904$), number of tachyzoites in peritoneal fluid (0.206; $p=0.114$) and decidual apoptotic index (0.014; $p=0.809$). Level of plasma $\text{IFN}\gamma$ was influenced by number of tachyzoites (0.647, $p=0.00$), and duration of infection (0.288; $p=0.01$) but not by dose of inoculation (0.023; $p=0.824$). Elevation of level of plasma $\text{IFN}\gamma$ increased caspase-3 activation (0.359; $p=0.013$) and apoptotic index of trophoblast via increasing of caspase 3 activation (0.962; $p=0.00$), but did not affect apoptotic index (0.082; $p=0.232$). Elevation of level of plasma $\text{IFN}\gamma$ did not increase activation of caspase-3 (-0.028, $p=0.654$), directly (0.057; $p=0.504$) nor indirectly (0.077, $p=0.395$) to apoptotic index of decidual cells. At third period of gestation trophoblast apoptotic index of trophoblast cells were significantly higher than those of decidual cells ($p < 0.05$). Increase of trophoblast apoptotic index decreases

number of fetus (0.718, $p=0.000$) and decidual apoptotic index did not influence number of fetus (0.014, $p=0.809$).

This study suggested that mechanism of pregnancy failure in *Toxoplasma* infection is more indirectly biochemistry-immunological aspect rather than directly parasitological aspect. Overproduction of systemic IFN γ due to RH strain of *Toxoplasma gondii* acute infection, significantly decrease number of litters (-0.377, $p=0.002$). It showed that there are still many possible molecular and cellular mechanisms that could not be explained in this research, and need more studies. Decreasing number of litters due to elevation of plasma IFN γ level also occurs via external pathway, that is by increase of trophoblast apoptosis initiated by increase of trophoblast caspase 3 activation. Infection occurred at first period of pregnancy and duration of infection, influenced degree and manifestation of pregnancy failure. Reduction number of litters caused by overproduction of IFN γ induced by RH strain of *Toxoplasma gondii* infection in mice, is led by role of macrophages that accumulated at or near implantation site. Activated macrophages will secrete more IFN γ locally, and cause more apoptosis of trophoblast cells. Pregnancy failure in toxoplasmosis is more initiated by fetal part rather than maternal part.

ABSTRACT

Influence of *Toxoplasma* Infection on Pregnancy Outcome through Gamma Interferon (IFN γ), Activation of Caspase 3 and Apoptosis of Placental Cells

*A laboratory experimental study on pregnant Balb/c mice inoculated by tachyzoites of RH strain *Toxoplasma gondii**

Teguh Wahyu Sardjono

Mechanism of pregnancy failure in toxoplasmosis is still not fully understood. Increase of IFN γ production, caspase-3 activation and apoptosis of placental cells due to infection of virulent strain of *Toxoplasma gondii*, are assumed to be some possible mechanisms. Eighty female BALB/c mice were monogamously mated, then divided into four dose groups, and injected intra-peritoneally by 10, 50, 100 tachyzoites of RH-strain of *Toxoplasma gondii* and PBS (control) respectively, on D9 post-mating (p.m). Effects of treatments were observed on D12 p.m and D15-16 p.m., represented second and third period of pregnancy respectively. Peritoneal tachyzoites were counted under Neubauer counting slide. Plasma IFN γ levels were examined by ELISA technique. Expression of caspase 3 on immuno-histochemistry and apoptotic index of trophoblast and decidua cells on HE and Apoptag stainings, were observed and counted under light microscope from 20 fields of 1000 magnifications.

This study showed that toxoplasmosis in pregnant mice decreases number of litters. ANOVA and Path Analysis showed that decreasing number of litters was influenced by duration of infection, increase of plasma IFN γ level, caspase-3 activation and apoptotic index of trophoblast cells ($p < 0.05$), but not by dose of inoculation, number of peritoneal tachyzoites, caspase-3 activation and decidual apoptotic index ($p > 0.05$). Plasma IFN γ level was influenced by number of intraperitoneal tachyzoites and duration of infection ($p < 0.05$) but not by dose of inoculation ($p > 0.05$). Plasma IFN γ level influenced activation of caspase 3 and apoptotic index of trophoblasts ($p < 0.05$), but not deciduas ($p > 0.05$). Number of tachyzoites did not influence apoptotic index of trophoblast and decidual cells ($p > 0.05$). Apoptotic index of trophoblast was significantly higher than decidual cells. All of those were only found on the third period of pregnancy or 6-7 days post inoculation.

This study suggested that mechanism of pregnancy failure in toxoplasmosis is more indirectly immunobiochemical aspect rather than directly parasitological aspect. Decreasing number of litters due to IFN γ overproduction as response to acute RH strain infection, suggested that there are still many possible molecular and cellular mechanisms that could not be explained in this research, and need more studies. Increase of trophoblast apoptosis initiated by activation of caspase 3, is led by role of macrophages accumulated at or near implantation site. Pregnancy failure in toxoplasmosis is more initiated by fetal part rather than maternal part.

Key words: Toxoplasmosis, IFN γ , caspase-3, trophoblast, apoptosis, pregnancy.

DAFTAR ISI

	Halaman
Sampul Depan	i
Sampul Dalam	ii
Prasyarat Gelar	iir
Persetujuan	iv
Penetapan Panitia	v
Ucapan terimakasih	vii
Ringkasan	xiv
Summary	xviii
Abstract	xxix
DAFTAR ISI	xxiii
DAFTAR GAMBAR DAN GRAFIK	xxx
DAFTAR TABEL	xxxii
DAFTAR LAMPIRAN	xxxiv
DAFTAR SINGKATAN	xxxv
BAB 1 : PENDAHULUAN	1
1.1. Latar Belakang Masalah	1
1.2. Rumusan Masalah	10
1.3. Tujuan Penelitian	11
1.3.1. Tujuan umum	11
1.3.2. Tujuan khusus	11
1.4. Manfaat Penelitian	12
1.4.1. Manfaat akademik	12
1.4.2. Manfaat praktis	12
BAB 2 .TINJAUAN PUSTAKA	14
2.1. <i>Toxoplasma</i> dan toksoplasmosis.	14

2.1.1. Biologi dan daur hidup <i>Toxoplasma gondii</i>	15
2.1.1.1. Tahizoit	15
2.1.1.2. Kista (bradizoit)	18
2.1.1.3. Ookista	20
2.1.1.4. Transmisi antar hospes	22
2.1.2. Perlekatan dan perkembangan parasit di dalam sel hospes	24
2.1.3. Virulensi dan daya patogenik <i>Toxoplasma gondii</i>	25
2.1.4. Respon hospes dan patologi pada infeksi <i>Toxoplasma gondii</i>	29
2.2. Fisiologi dan Immunologi Kehamilan	34
2.2.1. Jenis plasenta dan bagian-bagian yang menyusunnya	35
2.2.1.1. Trofoblas	41
2.2.1.2. Desidua	44
2.2.2. Mekanisme penerimaan dan penolakan buah kehamilan	46
2.2.2.1. Peran makrofag dan sitokin dalam penerimaan konseptus	48
2.2.2.2. Peran makrofag dan sitokin dalam penolakan konseptus	49
2.2.3. Keseimbangan respon Th-1 : Th-2 pada infeksi selama kehamilan	51
2.2.4. Bentuk kegagalan kehamilan yang terjadi akibat infeksi	54
2.2.4.1. Kematian dan resorpsi janin	54
2.2.4.2. Abortus dan lahir mati (<i>stillbirth</i>)	55
2.2.4.3. Kelahiran prematur/prematunitas	57
2.2.4.4. <i>IUGR</i> dan <i>low birth weight (LBW)</i>	58
2.2.4.5. Gangguan pertumbuhan dan cacat lahir	59
2.2.4.6. Penyakit bawaan	60
2.2.4.7. Lahir normal	61

2.2.5. Toksoplasmosis dan kehamilan pada manusia dan hospes lain..	61
2.3. Pertumbuhan dan Kematian Sel.	65
2.3.1. Nekrosis dan apoptosis	66
2.3.2. Apoptosis pada berbagai jenis sel tubuh	69
2.3.3. Tahap-tahap pada proses Apoptosis	71
2.3.4. Faktor-faktor yang berperan dalam pengendalian apoptosis.....	73
2.3.5. Deteksi dan pengukuran apoptosis pada sediaan irisan jaringan.	77
2.3.5.1 Elektroforesis DNA	77
2.3.5.2 Mikroskopik	78
2.3.5.3. Metoda TUNEL	78
2.3.5.4. Deteksi ekspresi enzim caspase-3 dengan metode imunohisto- kimia	79
2.3.5.5. Indeks apoptosis.	81
2.3.6. Peranan apoptosis dalam berbagai kondisi klinis.	81
2.3.6.1. Apoptosis pada penyakit infeksi	82
2.3.6.2. Apoptosis pada kehamilan normal dan dengan komplikasi	83
2.4. Penggunaan hewan coba dalam penelitian	87
2.4.1. Alasan penggunaan mencit sebagai hewan coba	87
2.4.1.1 Data biologik mencit	88
2.4.1.2. Sistem reproduksi mencit dan perbandingannya dengan manusia	89
2.4.2. Metoda mengawinkan mencit.	92
2.4.2.1. Perkawinan monogami	92
2.4.2.2. Perkawinan poligami	93
2.4.2.3 Waktu mengawinkan dan prediksi keberhasilan kebuntingan	93

2.4.3	Meningkatkan keberhasilan kebuntingan	94
2.4.3.1	Sinkronisasi oestrus	94
2.4.3.2	Sinkronisasi oestrus secara hormonal	95
2.4.3.3	Sinkronisasi oestrus dengan memanfaatkan pengaruh <i>pheromone</i>	95
2.4.3.4	Hal-hal lain yang mempengaruhi kesuburan mencit	97
2.4.4	Penggunaan mencit dalam penelitian toksoplasmosis	98
BAB 3 KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN		100
3.1	Kerangka Konseptual Penelitian	100
3.1.1	Toksoplasmosis dan berbagai galur <i>Toxoplasma gondii</i>	100
3.1.2	Peningkatan kadar IFN γ pada infeksi <i>Toxoplasma</i>	101
3.1.3	Respon imun pada kehamilan normal dan yang mengalami infeksi	102
3.1.4	Apoptosis dan hasil kehamilan	104
3.1.5	Peningkatan kadar IFN γ , ekspresi enzim <i>caspase 3</i> dan apoptosis	105
3.2	Hipotesis Penelitian	107
BAB 4 METODE PENELITIAN		108
4.1	Jenis Penelitian	108
4.1.1	Rancangan/Desain Penelitian	108
4.1.2	Jumlah Replikasi	108
4.1.3	Identifikasi Variabel	111
4.2	Definisi Operasional	112
4.3	Bahan penelitian	115
4.3.1	Hewan coba	115
4.3.2	Bahan inokulan	115

4 3 3	Bahan pemeriksaan	115
4 3 4	Bahan-bahan kimia	116
4 4	Waktu, tempat, tahap-tahap dan prosedur penelitian...	116
4 4 1	Tahap persiapan	117
4 4 1 1	Pengadaan hewan coba	117
4 4 1 2	Sinkronisasi oestrus dan jadwal perkawinan	117
4.4.2	Tahap inokulasi dan pembedahan mencit	118
4 4 3	Penyediaan inokulan tachizoit <i>Toxoplasma gondii</i>	119
4 4 4	Tahap eksperimen/perlakuan	120
4.4.4.1	Inokulasi tachizoit dan pengamatan setelah infeksi:	120
4.4.5	Tahap pengamatan hasil perlakuan	121
4 4 5 1	Pengamatan perubahan fisik	121
4 4 5 2	Pengambilan sampel darah	121
4 4 5 3	Pembedahan mencit.	122
4 4 5 4	Pemeriksaan kadar sitokin IFN- γ plasma	122
4 4 5 5	Pemeriksaan organ dan jaringan	122
4 4 5 6	Penilaian hasil kebuntingan	122
4 4 5 7	Pembuatan sediaan jaringan	123
4.4.5.8	Pemeriksaan histopatologik untuk sel-sel apoptotik dan ekspresi enzim caspase 3	123
4 4 5 9	Penghitungan sel-sel yang mengalami apoptosis	124
4 4 6	Tahap pengumpulan dan pencatatan data hasil perlakuan	126
4 4 6 1	Pada saat pembedahan	126
4 4 6 2	Data lain yang diperoleh setelah pembedahan	126

4.4.7. Analisis data	126
BAB 5 . H A S I L	128
5.1 Karakteristik sampel mencit yang diteliti	128
5.1.1. Mencit bunting	128
5.1.2. Angka kematian mencit setelah infeksi <i>Toxoplasma</i>	129
5.1.3. Mencit-mencit yang ikut serta dalam analisis setelah pembedahan	131
5.1.4. Jumlah janin rata-rata pada masing-masing kelompok mencit.....	132
5.1.5. Hasil hitung takhizoit dalam cairan peritoneum mencit	136
5.1.6. Hasil pengukuran kadar IFN- γ serum mencit pasca inokulasi.....	137
5.1.7. Hasil pemeriksaan histopatologi jaringan plasenta.	139
5.1.7.1. Ekspresi <i>caspase 3</i> pada sel-sel desidua dan trofoblas	140
5.2. Hasil pengamatan kualitatif secara histopatologi	142
5.2.1. Gambaran sel-sel apoptotik pada pewarnaan HE dan Apoptag	142
5.2.2. Gambaran jaringan uterus hamil yang mengalami regresi sempurna	147
5.3.. Hasil analisis jalur dan variabel yang diamati	148
BAB 6 : PEMBAHASAN	151
6.1. Pengaruh infeksi <i>Toxoplasma</i> terhadap kehamilan	151
6.1.1. Infeksi <i>Toxoplasma</i> pada mencit bunting menurunkan jumlah janin.	151
6.1.2. Pengaruh dosis dan lama infeksi <i>Toxoplasma</i> pada kehamilan	153
6.1.3. Pengaruh hubungan hospes-parasit pada manifestasi klinik	156
6.1.4. Pengaruh keberadaan parasit di jaringan pada kehamilan	162
6.2 Pengaruh infeksi <i>Toxoplasma</i> pada produksi IFN- γ plasma	165
6.2.1. Pengaruh agent, dosis dan lama infeksi pada produksi IFN γ	167

6.2.2 Infeksi <i>Toxoplasma gondii</i> galur RH memicu overproduksi IFN γ	169
6.3. Kadar sitokin IFN- γ , infeksi <i>Toxoplasma</i> dan kehamilan	172
6.3.1. Peran sel NK dan makrofag dalam produksi IFN γ pada kehamilan ...	174
6.3.2. Pengaruh peningkatan IFN γ plasma terhadap hasil kehamilan	177
6.4 Peningkatan kadar IFN γ , ekspresi caspase 3 dan apoptosis	180
6.4.1 Apoptosis dan mekanisme homeostasis pada kehamilan	180
6.4.2 Peningkatan kadar IFN γ dan apoptosis sel-sel plasenta	182
6.5 Pengaruh apoptosis sel-sel plasenta pada hasil kehamilan	183
6.5.1 Apoptosis pada sel-sel trofoblas dan hasil kehamilan	183
6.5.2. Apoptosis pada sel-sel desidua	185
6.6. Beberapa hasil samping di luar hipotesis	186
6.6.1 Sel-sel eritrosit benoti pada jaringan plasenta	186
6.6.2. Trombosis sebagai salah satu penyebab kegagalan kehamilan	187
6.6.2. Metoda sinkronisasi oestrus alami pada mencit	189
6.6.3 Pewarnaan ganda (HE dan Apoptag) untuk diagnosis apoptosis ...	193
6.6.4 Kondisi geografis, musim dan kejadian toksoplasmosis	194
6.6.5. Pemilihan isolat <i>Toxoplasma gondii</i> pada penelitian <i>in vivo</i> ...	196
BAH 7 PENUTUP	197
7.1 Kesimpulan	197
7.2 Saran	200
Daftar Pustaka	202
Lampiran-lampiran	217
Riwayat Hidup	262

DAFTAR GAMBAR DAN GRAFIK

		halaman
Gambar 2.1.1	Ultra struktur <i>Toxoplasma gondii</i> bentuk tachizoit (A) dan bradizoit (B)	16
Gambar 2.1.2	Tachizoit <i>Toxoplasma gondii</i> di dalam sel makrofag (A), dan di dalam cairan peritoneum mencit (B)	16
Gambar 2.1.3	Kista <i>Toxoplasma gondii</i> dalam jaringan otot	19
Gambar 2.1.4	Ookista <i>T. gondii</i>	21
Gambar 2.1.5.	Siklus hidup dan Transmisi <i>Toxoplasma gondii</i> antar hospes	23
Gambar 2.1.6	Dendrogram dari 11 <i>zmoderne Toxoplasma gondii</i>	27
Gambar 2.1.7	Respon kekebalan hospes pada toxoplasmosis	31
Gambar 2.1.8.	<i>Transmission electron micrograph</i> dan tachyzoite <i>Toxoplasma gondii</i> yang sedang melakukan penetrasi ke neutrofil dalam peritoneum mencit	32
Gambar 2.1.9.	Bagan tahap-tahap yang terjadi pada infeksi <i>Toxoplasma</i>	33
Gambar 2.2.1.	Pembagian plasenta berdasarkan bentuk dan tempat perlekatan fetal ke maternal	36
Gambar 2.2.2.	Lapisan jaringan fetal dan maternal yang menyusun plasenta	38
Gambar 2.2.3.	Diferensiasi trofoblast di tempat implantasi	42
Gambar 2.2.4	Hubungan antara pola reaktivitas Th-2 dan Th-1 pada kehamilan	53
Gambar 2.3.1	Tahap-tahap apoptosis pada sel limfosit	68
Gambar 2.3.2	Gambaran skematik peristiwa apoptosis	72
Gambar 2.3.3	Mekanisme pengendalian molekuler pada apoptosis	75
Gambar 2.3.4	Ringkasan mekanisme pengendalian pada apoptosis	76
Gambar 2.3.5	Perbedaan distribusi makrofag dan produksi sitokin pada kehamilan normal dan kehamilan dengan komplikasi IUGR dan preeklamsi	84
Gambar 3.1	Bagan perkembangan subset sel T CD4, Th1 dan Th2 pada infeksi parasit intraseluler dan pengaruhnya terhadap kehamilan	103

Gambar 3.2	Kerangka konsep penelitian	106
Gambar 4.1.	Skema /jadwal perlakuan terhadap hewan coba	119
Gambar 4.2.	Langkah-langkah operasional dalam penelitian	125
Gambar 4.3.	Model hipotetik untuk pengujian variabel	127
Gambar 5.1	Mencit yang masih hidup (%) selama pengamatan	130
Gambar 5.2.	Perbandingan jumlah embrio dan ukuran uterus dari masing-masing kelompok mencit hamil pada saat pembedahan	133
Gambar 5.3.	Perbandingan ukuran uterus dan jumlah embrio dari masing-masing kelompok mencit hamil sebelum dibuat sediaan histo PA (sudah di formalin)	134
Gambar 5.4.	Jumlah janin rata-rata pada tiap kelompok dosis	135
Gambar 5.5.	Jumlah takhizoit rata-rata tiap kelompok	136
Gambar 5.6.	Kadar IFNy rata-rata tiap kelompok	138
Gambar 5.7	Ekspresi caspase-3 pada sel desidua dan trofoblas	140
Gambar 5.7.1.a	Jumlah rata-rata sel trofoblas yang mengekspresikan caspase-3 pada masing-masing kelompok mencit dengan pewarnaan imunohistokimia	141
Gambar 5.7.1.b	Jumlah rata-rata sel desidua yang mengekspresikan caspase-3 pada masing-masing kelompok mencit dengan pewarnaan imunohistokimia	142
Gambar 5.8.	Gambaran apoptosis dari sel-sel trofoblas dan desidua pada sediaan histo-PA dengan pewarnaan HE dan Apoptag	143
Gambar 5.8.1.a	Indeks apoptosis rata-rata sel trofoblas pada pewarnaan HE	144
Gambar 5.8.1.b	Indeks apoptosis rata-rata sel desidua pada pewarnaan HE	145
Gambar 5.8.2.a	Indeks apoptosis rata-rata sel trofoblas pada pewarnaan Apoptag	146
Gambar 5.8.2.b	Indeks apoptosis rata-rata sel desidua pada pewarnaan Apoptag	145
Gambar 5.9.	frisan jaringan uterus hamil yang mengalami regresi sempurna	147
Gambar 5.10	Analisis jalur pengaruh toxoplasmosis terhadap jumlah janin	149

DAFTAR TABEL

	halaman
Tabel 2.2.1	Pembagian jenis plasenta berdasarkan bentuk dan tempat perlekatan antara komponen maternal dan fetal 37
Tabel 2.2.2	Klasifikasi dari berbagai jenis plasenta berdasarkan jumlah lapisan jaringan maternal dan fetal yang masih tersisa 39
Tabel 2.2.3	Jenis-jenis plasenta dari berbagai jenis mamalia 40
Tabel 2.2.4	Strategi penting untuk melindungi fetal-plasental semi-alograft 47
Tabel 2.2.5	Berbagai faktor yang disebut sebagai penyebab abortus 57
Tabel 2.2.6	Manifestasi klinik dan janin yang terinfeksi TORCH selama kehamilan yang terlihat pada pengamatan saat lahir 60
Tabel 2.3.1	Perbedaan antara nekrosis dan apoptosis 69
Tabel 2.3.2	Apoptosis pada berbagai sel tubuh 70
Tabel 2.4.1	Data biologik mencit 89
Tabel 2.4.2	Perkembangan embrio mencit dalam uterus pascakonsepsi 90
Tabel 2.4.3	Perkembangan embrio manusia pasca konsepsi 91
Tabel 2.4.4	Perbandingan perkembangan embrio mencit dan manusia pasca konsepsi 97
Tabel 2.4.5	Komposisi kebutuhan makanan dan kandungan dalam pellet 97
Tabel 4.1	ANOVA RAL (Rancang Acak Lengkap) 109
Tabel 4.2	Rincian perlakuan, waktu pembedahan dan variabel yang diukur 111
Tabel 5.1	Jumlah dan distribusi mencit yang hamil (pengamatan secara fisik) 129
Tabel 5.2	Angka kematian mencit setelah infeksi <i>Toxoplasma</i> 130
Tabel 5.3	Jumlah dan distribusi mencit hamil setelah pengelompokan ulang 132
Tabel 5.4	Jumlah anak mencit rata-rata tiap kelompok dan <i>p-value Post Hoc Anova test</i> 135
Tabel 5.5	Jumlah takhizoit rata-rata ($\times 10^4/\mu\text{m}^3$) pada tiap kelompok dan <i>p-value Post Hoc Anova test</i> 136
Tabel 5.6	Kadar IFN- γ rata-rata (ng/ml) tiap kelompok dan <i>p-value Post Hoc Anova test</i> 138

Tabel 5.7.	Jumlah rata-rata sel trofoblas dan desidua yang mengekspresi caspase-3 pada masing-masing kelompok mencit dengan pewarnaan imunohistokimia menggunakan antibodi anti rabbit caspase-3 dan <i>p-value</i>	141
Tabel 5.8.1	Indeks apoptosis rata-rata sel trofoblas dan desidua pada masing-masing kelompok mencit dengan pengecatan Hematoksilin Eosin (HE) dan <i>p-value Post Hoc Anova test</i>	144
Tabel 5.8.2	Indeks apoptosis rata-rata sel trofoblas dan desidua pada masing-masing kelompok mencit dengan pengecatan imunohistokimia menggunakan Apoptag Kit dan <i>p-value Post Hoc Anova test</i>	145



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1	Cara pemberian nomor/kode pada mencit	217
Lampiran 2	Lembar pencatatan data observasi mencit sejak partus sampai dengan saat pembedahan	219
Lampiran 3	Bahan inoculan dan pelaksanaan inoculasi <i>Toxoplasma gondii</i>	223
Lampiran 4	Metoda sinkronisasi oestrus dan megawinkanan mencit	225
Lampiran 5	Prosedur pemeriksaan IFN γ dengan kit ELISA	227
Lampiran 6a	Prosedur pembuatan sediaan dan pewamaan imunohisto-kimia	233
Lampiran 6b	Prosedur pembuatan sediaan jaringan dan pewamaan HE	234
Lampiran 6c	<i>Apoptag Insitu Apoptosis Detection Kit Manual</i>	235
Lampiran 7	Prosedur penghitungan sel-sel apoptosis	238
Lampiran 8	Lembar Kerja penghitungan jumlah sel-sel apoptosis	240
Lampiran 9	Analisis Statistik : Oneway Anova	241
Lampiran 10	Gambar dan tabel hasil analisis jalur (Path Analysis)	259
Lampiran 11	Surat Keterangan bahwa penelitian telah dilakukan sesuai standar yang berlaku (Kelas P2)	261

DAFTAR SINGKATAN

ANA	: Anti Nuclear Antibody
ANOVA	: Analysis of Variance
APA	: Anti phospholipid antibody
APL	: Anti phospholipid
BALB/c, C57BL/10Wt, A/J . DBA/2J, C3H/HcJ	: nama berbagai jenis/ galur mencit
Caspase	: Cysteine-aspartic acid protease
CD	: Cluster of Differentiation
CED	: <i>Caenorhabditis elegans</i> Death genes
CMI	: Cell Mediated Immune response
CRP	: C- Reactive Protein
CSF	: Colony Stimulating Factor
CT	: Cyto trophoblast
db-galat	: derajat bebas galat
df-error	: degrees of freedom error
DNA	: Deoxyribose Nucleic Acid
EGF	: Endothelial Growth Factor
ELISA	: Enzyme Linked Immunosorbent Assay
fgl2	: fibrinogen-related procoagulant
FKUB	: Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya
FKUI	: Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia
GM-CSF	: Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor
GRA protein	: Granule Protein
H-1, H-2 dst	: Hari ke-1, Hari ke-2 dan seterusnya
HCG	: Human Chorionic Gonadotropin
HE	: Hematoksilin Eosin
HIV	: Human Immuno-deficiency virus
HLA DR	: Human Leukocyte Antigen class DR
HPV	: Human Papilloma virus
ICE	: Interleukin Converting Enzyme
IFNγ	: Interferon-gamma

XXXX

IgA	: Immunoglobulin A
IgG	: Immunoglobulin G
IgM	: Immunoglobulin M
IL	: Interleukin
IUGR	: Intra Uterine Growth Retardation
Lab OBG	: Laboratorium Obsetri Ginekologi
LAK cells	: Lymphokine-Activated Killer cells
LGL	: Large Granular Lymphocyte
LMWH	: Low Molecular Weight Heparin
LPD	: Luteal Phase Defect
MHC	: Major Histocompatibility Complex
NGF	: Nerve Growth Factor
NK	: Natural Killer
NO	: Nitric Oxide
p.i	: pasca infeksi
p.k.	: pasca kawin
PAU-Biotek	: Pusat Antar Universitas-Laboratorium Bioteknologi
PCR	: Polymerase Chain Reaction
PDGF	: Platelet Derived Growth Factor
PIBF	: Progesterone-Induced Blocking Factors
PMN	: Polymorphonuclear
PMSG	: Pregnant Mare's Serum Gonadotropin
PSAB	: Previous Spontaneous Abortion
Pusvetma	: Pusat Veterinaria Farma
PV	: Parasitophorous Vacuole
PVM	: Parasitophorous Vacuole Membrane
RAL	: Rancangan Acak Lengkap
RCD	: Randomized Completely Design
RH, 76K Beverly, Me49, PTG, Prugniaud, Swiss	: Nama berbagai galur <i>Toxoplasma gondii</i>
ROP	: Rhoptry Protein
ROS	: Reactive Oxygen Species

RPL	: Repetitive Pregnancy Loss
RSCM	: Rumah Sakit dr. Cipto Mangunkusumo
RSSA	: Rumah Sakit dr. Saiful Anwar
SAB	: Spontaneous Abortion
SAG	: Surface Antigen
ST	: Syncitio trophoblast
TGF	: Transforming Growth Factor
Th-1	: T- helper 1
Th-2	: T- helper 2
TMN	: Tubulo-vesicular Membranous Network
TNF	: Tumor Necrosis Factor
TORCH	: <i>Toxoplasma, Rubella, Cytomegalovirus, Herpes simplex</i>
TPA	: Tempat Pembuangan Akhir
TUNEL	: Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated-dUTP Nick end Labelling
UGM	: Universitas Gajah Mada
UK	: United Kingdom
uNK	: Uterine-Natural Killer
Z	: Zymodeme



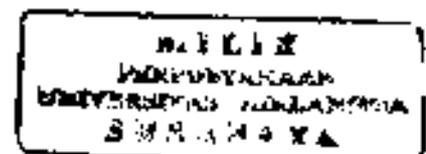
BAB I

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang Masalah

Toxoplasma gondii adalah parasit penyebab toksoplasmosis, yaitu salah satu penyakit dalam jajaran *TORCH* yang sering menjadi topik kajian ilmiah. Infeksi *Toxoplasma gondii* pada manusia dijumpai di seluruh benua, dan menjangkiti lebih dari separoh penduduk dunia. Hal ini berhubungan dengan sifat biologis dan siklus hidup *Toxoplasma gondii* yang unik dan spesifik, sehingga memudahkan terjadinya infeksi pada hewan dan manusia (Kasper and Boothroyd, 1993; Remington *et al.*, 1995; Stray-Pedersen, 1997).

Telah diketahui bahwa infeksi *Toxoplasma gondii* yang terjadi pada hewan ternak menyebabkan penurunan produktivitas sehingga berdampak besar secara sosioekonomi. Toksoplasmosis pada manusia berdampak lebih luas, tidak saja secara medik praktis, tetapi juga secara psikososial, terutama bagi penderita dan keluarganya. Toksoplasmosis pada wanita hamil dapat menyebabkan kegagalan kehamilan dengan berbagai bentuk dan derajat manifestasi klinis seperti abortus, kelahiran bayi imatur, prematur, berat badan rendah, lahir cacat atau mati. Infeksi pada trimester awal dari kehamilan, pada umumnya menimbulkan manifestasi yang berat seperti abortus atau lahir mati, tetapi jarang menimbulkan toksoplasmosis kongenita. Sebaliknya, infeksi pada trimester akhir jarang menyebabkan manifestasi klinis yang nyata, tetapi sering menimbulkan toksoplasmosis kongenita, yang manifestasinya belum terlihat pada saat lahir (McCabe, 1990; Russo, 1994; Remington, 1995). Mengapa dan bagaimana hal tersebut dapat terjadi, sampai sekarang banyak pendapat yang diajukan dan semuanya masih memerlukan pembuktian dan kajian lebih jauh.



Prevalensi toksoplasmosis pada manusia pada umumnya dinyatakan atas dasar hasil pemeriksaan serologis. Di berbagai tempat di dunia seperti di UK, Yunani dan Perancis prevalensi toksoplasmosis di kalangan wanita hamil berkisar antara 10% - 55%, (Decavalas *et al.*, 1990 ; Allain *et al.*, 1998, Jenum *et al.*, 1998) Di Indonesia, prevalensi toksoplasmosis pada berbagai populasi dilaporkan dalam angka yang bervariasi, yaitu antara 2,3 - 67,8% (Partono dan Cross, 1975, Gandahusada, 1977). Prevalensi toksoplasmosis pada wanita hamil di RSCM Jakarta, RS Sardjito Yogyakarta dan RSSA Malang masing-masing adalah 14,3%, 20,8% dan 18,7% (Sayogo, 1980; Pranoto, 1984; Sardjono, 1988).; sedangkan pada ibu-ibu yang mempunyai nwayat abortus di RSCM Jakarta yang dilaporkan pada tahun yang berbeda masing-masing adalah 21,5% (Gandahusada, 1985) dan 67,8% (Samil 1988). Di RS Saiful Anwar Malang (RSSA), prevalensi IgG *Toxoplasma* pada ibu-ibu yang mengalami abortus spontan adalah 53,48% dan IgM adalah 6,98% (Sardjono, 2001a) Belum diperoleh kepustakaan yang menyebutkan tentang prevalensi toksoplasmosis pada wanita dengan berbagai manifestasi kegagalan kehamilan

Dan seluruh kejadian kegagalan kehamilan, 25-40% di antaranya terjadi pasca implantasi (Klein & Remington, 1995; Norwitz *et al.*, 2001). Kejadian kegagalan kehamilan di Poliklinik Kandungan Bagian Obstetri Ginekologi RSSA Malang selama periode Januari 1995 – Desember 1996, dari 18.155 kunjungan pasien tercatat sebanyak 18,5%, yaitu meliputi abortus (9,35%), lahir mati (4,39%), lahir prematur (3,99%), dan lahir cacat (0,77%). (RSSA-Lab OBG, 1997) Dari berbagai manifestasi kegagalan kehamilan tersebut, abortus merupakan kasus yang paling sering terjadi. Data berbagai klinik atau rumah sakit lain menyebutkan prevalensi abortus dalam angka yang bervariasi, yaitu berkisar

antara 12% - 15% (Hatasaka, 1994, Chung *et al.*, 1996). Prevalensi abortus di Amerika dilaporkan hanya sekitar 2% (Koonin, 1998), tetapi di Inggris, perdarahan pada kehamilan kurang dari 20 minggu terjadi pada seperlima dari ibu-ibu hamil, dan lebih dari separohnya berakhir dengan abortus (Everet, 1997). Di Bagian Obstetri-Ginekologi FKUI, jumlah *Previous Spontaneous Abortion* (PSAB), pada tahun 1984 tercatat sebanyak 3 013 dari 30 582 kunjungan pasien atau 9,85% (Bernard dan Sastrawinata, 1984). Namun, angka-angka tersebut hanya sekedar data di rumah sakit, dan tidak dapat menggambarkan kondisi riil yang terjadi di masyarakat, atau menjelaskan kemungkinan penyebabnya. Peristiwa kegagalan kehamilan yang terjadi di masyarakat sebenarnya mungkin dua atau tiga kali lebih sering daripada yang dilaporkan tersebut (Hatasaka, 1994, Chung *et al.*, 1996).

Kegagalan kehamilan merupakan fenomena klinik yang penyebabnya sangat kompleks (multifaktoral) dan sulit dipastikan. Dan kalangan wanita yang mengalami abortus berulang misalnya, penyebab yang dapat diidentifikasi ternyata tidak lebih dari 50%. Hal-hal tersebut meliputi faktor genetik, kelainan anatomik, gangguan endokrin, imunologik, infeksi dan lain-lain (Hatasaka, 1994, Dudley, 1995, Chung *et al.*, 1996). Di antara faktor-faktor tersebut, infeksi adalah salah satu penyebab yang perlu diperhatikan (Brent and Beckman, 1994).

Patogenesis kegagalan kehamilan diperkirakan terjadi melafur berbagai mekanisme, namun pada dasarnya hal tersebut dapat diakibatkan oleh semua keadaan yang menyebabkan terlepasnya buah kehamilan dari tempat perlekatan pada dinding uterus lebih dini dari semestinya. Hal tersebut mungkin berupa proses mekanik yang terjadi secara lokal, faktor-faktor sistemik yang saling berpengaruh satu dengan yang lain, atau mungkin terdiri dari serangkaian proses yang masih memerlukan penelitian dan penjelasan yang lebih pasti.

Buah kehamilan (janin) pada dasarnya adalah suatu benda asing yang tinggal di dalam rongga uterus selama jangka waktu tertentu. Keberadaan janin ini dipelihara oleh suatu organ yang unik, yaitu plasenta. Walaupun hanya bersifat sementara, organ ini mutlak diperlukan, karena selain berfungsi nutritif, plasenta juga berfungsi sebagai paru, ginjal dan liver yang menjamin kehidupan janin. Plasenta juga memproduksi protein dan hormon yang mengatur aktivitas fisiologis dari kehamilan dan merupakan organ yang berperan dalam sistem kekebalan janin (Cross, 1994, Beckerman, 1997, Bowen, 2001). Sehubungan dengan fungsinya yang sangat kompleks tersebut, maka peran atau keterlibatan plasenta dalam peristiwa kegagalan kehamilan sangat penting.

Plasenta terdiri dari jaringan trofoblas yang disusun oleh sel-sel yang berasal dari pertumbuhan janin, dan jaringan desidua yang berasal dari pertumbuhan lapisan endometrium ibu. Pertumbuhan sel-sel trofoblas maupun sel-sel desidua, keduanya sama-sama dipengaruhi oleh berbagai mediator kimia, termasuk hormon-hormon pertumbuhan (*growth factors*) dan berbagai jenis sitokin yang diproduksi secara lokal maupun sistemik (Cross, 1994, Cunningham, 1997, Couam, 2000). Komunikasi antar sel-sel desidua dan trofoblas dikendalikan oleh berbagai jenis sitokin dan reseptor di permukaan masing-masing sel. Hasil dari komunikasi antar sel tersebut, adalah terjadinya berbagai perubahan ekspresi dari jenis dan jumlah sitokin yang ada, termasuk *colony stimulating factors* (CSF), *Tumor Necrosis Factor* (TNF)- α , *transforming growth factor* (TGF)- β , dan berbagai jenis *interferon* (IFN) dan *interleukin* (IL). Keseimbangan produksi dan interaksi antara berbagai jenis sitokin, yang bersifat pro-inflamasi ($Th-1$) atau anti-inflamasi ($Th-2$) sangat menentukan keberhasilan kehamilan. Pada fase imunitas sitokin $Th-1$ seperti IFN- γ dan IL-2 secara dominan mengendalikan

proses angiogenesis dan invasi sel-sel trofoblas. Pada kehamilan normal, segera setelah implantasi selesai, terjadi pergeseran dominasi dari Th-1 ke Th-2. Bila proses pergeseran ini tidak terjadi dan dominasi Th1 tidak terkendali, maka Th-1 justru memicu terjadinya kegagalan kehamilan (Wegmann, 1993, Guilbert, 1996; Cunningham, 1997, Coulam, 2000; Stemmer, 2000).

Selain yang telah disebut di atas, hal lain yang dapat dikemukakan sebagai salah satu mekanisme berakhirnya kehamilan adalah apoptosis (*programmed cell death*). Apoptosis pada sel-sel jaringan plasenta terjadi selama kehamilan berlangsung, dan meningkat secara progresif seiring dengan usia kehamilan (Halperin, 2000). Apoptosis pada sel-sel plasenta bayi aterm yang lahir melalui tindakan *sectio caesaria*, tidak berbeda bermakna dengan plasenta bayi aterm yang lahir normal (Thiet *et al.*, 2000). Pada kehamilan ektopik, apoptosis ditemukan meningkat hanya pada sel-sel trofoblas, dan tidak pada sel-sel desidua (Kokawa, 1998a), tetapi pada kasus abortus, apoptosis ditemukan meningkat baik pada sel-sel vili khonionik maupun desidua (Kokawa, 1998b). Sepanjang dapat ditelusuri, belum ditemukan kepustakaan yang menyebutkan bahwa ada perbedaan derajat apoptosis antara sel-sel trofoblas dan desidua pada berbagai manifestasi kegagalan kehamilan. Apoptosis adalah peristiwa yang terus menerus terjadi dan diperlukan sepanjang pertumbuhan normal dari janin, sampai pada saat yang tepat janin lahir sebagai bayi yang sehat dan normal. Berakhirnya proses kehamilan sebelum waktunya atau kehamilan gagal, pada dasarnya disebabkan oleh peningkatan apoptosis, yang terjadi karena adanya faktor-faktor ekstrinsik, termasuk karena adanya infeksi.

Telah disebutkan bahwa toksoplasmosis adalah salah satu penyakit infeksi yang dapat menjadi penyebab terjadinya kegagalan kehamilan. Sumber utama

penularan toksoplasmosis adalah kotoran kucing yang mengandung ookista, yang kemudian mencemari lingkungan, termasuk tanah, air, rumput dan sayuran. Pencemaran ini dapat menyebabkan hewan-hewan liar dan ternak seperti ayam, kambing, sapi dan sebagainya, dengan mudah terinfeksi oleh penyakit ini. Dari beberapa penelitian sero-epidemiologi yang telah dilakukan pada berbagai populasi di Malang ditemukan angka kejadian yang relatif tinggi, yaitu antara 18,63% - 57,7% (Sardjono, 1988; Sardjono, 1995; Sardjono, 1998; Sardjono, 2000). Untuk mengetahui latar belakang lebih jauh tentang tingginya prevalensi tersebut, telah dilakukan penelitian untuk mencari kista pada tinja kucing liar di berbagai tempat di Malang.

Selama bulan Mei sampai dengan Agustus 2002 telah ditangkap sebanyak 32 ekor kucing dari tiga pasar dan dua tempat pembuangan sampah (TPA) di kota Malang. Masing-masing kucing dikandangkan tersendiri, ditampung tinjanya setiap hari selama satu minggu, lalu diperiksa dengan metoda apusan langsung. Hasilnya ternyata sebagian besar tinja kucing-kucing tersebut mengandung kista *Isospora*, telur *Toxocara* dan *Ankylostoma*. Tidak satupun diantara sampel tinja yang diperiksa mengandung ookista *Toxoplasma* (Sardjono, 2002b). Hal ini berbeda dengan hasil penelitian di Surabaya di mana ditemukan ookista *Toxoplasma* pada 27% dari tinja kucing liar dan 15% dari tinja kucing peliharaan (Retno, 1998).

Walaupun angka kejadian toksoplasmosis pada manusia cukup tinggi, namun bahwa penyakit ini merupakan penyebab utama terjadinya kegagalan kehamilan belum benar-benar terbukti. Seberapa besar peran toksoplasmosis, serta bagaimana ia dapat mempengaruhi hasil kehamilan, masih terus diperdebatkan. Besarnya korelasi antara kejadian toksoplasmosis dengan

kegagalan kehamilan disebutkan dalam angka-angka dengan kisaran yang luas, yaitu antara 1,38% - 7,1% sampai dengan 55% - 73,3% (Stojanovic, 1998, Crucesescu, 1998, Alfintas, 1997, Zargar, 1998; Owen, 1998b); namun sampai saat ini belum ada yang menjelaskan berapa besar pengaruh toksoplasmosis terhadap hasil kehamilan serta bagaimana sebenarnya mekanisme terjadinya kegagalan kehamilan akibat toksoplasmosis tersebut. Hal ini disebabkan antara lain karena manifestasi klinik yang terjadi akibat infeksi *Toxoplasma* sangat bervariasi (Dardé, 1996). Di sisi lain, dalam praktek sehari-hari galur parasit yang menginfeksi serta dosis serta saat dan lama terjadinya infeksi sulit diperkirakan bahkan tidak dapat diketahui dengan pasti.

Secara umum, berbagai galur *Toxoplasma* dapat dibagi menjadi tiga golongan, yaitu yang mempunyai tingkat virulensi tinggi, menengah, dan rendah atau tidak virulen. Tingkat virulensi dan patologi yang terjadi sangat dipengaruhi oleh galur parasit yang menginfeksi. Infeksi oleh galur type I yang virulen (RH), dapat menyebabkan kematian mencit dalam waktu yang relatif singkat yaitu sekitar 6-10 hari pasca infeksi. Infeksi galur type II (tingkat virulensi sedang) atau type III (virulensi rendah atau non-virulen), dengan dosis yang bervariasi antara 10^1 - 10^7 baru menyebabkan kematian mencit dalam waktu 10 sampai 20 hari pasca infeksi (Evans, 1992, Guo and Johnson, 1996). Selain faktor parasit, faktor hospes juga ikut berperan terhadap tingkat virulensi parasit. Mencit galur BALB/c dikenal lebih resisten dibandingkan mencit galur C57BL/6 atau Swiss-Webster (Roberts and Alexander, 1992, Dubey, 1999, Kobayashi, 1999).

Banyak bukti yang menunjukkan bahwa status dan respon kekebalan hospes memegang peran yang besar dalam manifestasi klinik. Sekresi berbagai jenis sitokin proinflamasi (Th1) sebagai respon kekebalan seluler, merupakan hal

yang normal terjadi terutama pada infeksi patogen intraseluler, termasuk *Toxoplasma* (Bliss, 1999; Denney, 1999). Infeksi oleh *Toxoplasma gondii* yang berasal dari galur type I (RH) ataupun type II (PTG) dengan dosis letal dapat menyebabkan peningkatan produksi sitokin-sitokin Th1 seperti TNF α , IFN γ , IL-12 dan IL-18 sampai pada kadar yang sangat tinggi. Pada mencit, respon sitokin Th1 yang IFN γ -dependent, sangat penting dalam mekanisme pengendalian infeksi terhadap toksoplasmosis yang disebabkan oleh galur type II; tetapi produksi IFN γ yang berlebihan pada infeksi oleh galur type I justru merugikan dan bahkan menyebabkan kematian (Mordue, 2001). Kematian pada mencit akibat infeksi *Toxoplasma*, disebabkan karena peningkatan produksi IFN γ yang menimbulkan kerusakan luas pada jaringan organ-organ vital seperti hati, otak dan paru (Dardé, 1996; Dubey, 1999). Ternyata peningkatan produksi IFN γ pada toksoplasmosis juga menginduksi terjadinya apoptosis melalui jalur ekstrinsik, yaitu yang dikendalikan oleh *Fas* (*Fas-dependent apoptosis*) pada sel-sel T pada *Peyer's patch* dan sel-sel plasenta (Liesenfeld, 1999; Liu, 2002).

Atas dasar hal-hal tersebut di atas, maka dalam kajian ini dikemukakan bahwa salah satu mekanisme terjadinya kegagalan kehamilan akibat toksoplasmosis adalah peningkatan apoptosis sel-sel desidua dan trofoblas, melebihi apoptosis pada kehamilan normal. Peningkatan apoptosis ini terjadi melalui jalur ekstrinsik, yaitu peningkatan kadar IFN γ dan terbentuknya ikatan Fas-FasL yang memicu aktivitas caspase 8 dan 10, kemudian mengaktifkan *effector caspases* yang berada di bawahnya yaitu caspase 3, 6 dan 7 (Budiharjo, 1999; Anonymous, 2003). Caspase 3 merupakan caspase efektor utama yang teraktivasi selama hampir seluruh proses apoptosis. Peningkatan aktivitas enzim caspase 3 di dalam sel diketahui dari ekspresinya yang nampak pada pemeriksaan imunohistokimia.

dan ini dijadikan dasar untuk mendeteksi sel-sel yang memasuki awal proses apoptosis (Pizem and Cor, 2003, Sanchez-Torres, 2003)

Sehubungan dengan hal tersebut, pada bulan Maret sampai dengan Juni 2000 penulis telah melakukan suatu penelitian pendahuluan dengan tujuan untuk membuktikan adanya peningkatan apoptosis sel-sel plasenta pada kasus-kasus abortus spontan. Penelitian tersebut juga bertujuan untuk mendeteksi adanya parasit *Toxoplasma gondii* di jaringan plasenta pada kejadian abortus spontan di RSSA Malang (Sardjono, 2002a). Penelitian dilakukan secara *cross-sectional* dengan mengambil sampel darah dan jaringan kerokan sisa kehamilan dari ibu-ibu yang mengalami abortus spontan. Sejumlah 43 sampel darah diperiksa adanya zat anti *Toxoplasma* dengan metoda ELISA. Hasilnya menunjukkan bahwa tidak ada perbedaan bermakna antara kadar antibodi IgM dan IgG pada wanita yang mengalami abortus dengan wanita hamil normal ($p > 0,05$). Pada pemeriksaan PCR terhadap 43 contoh jaringan sisa abortus tidak ditemukan adanya DNA *Toxoplasma*. Hasil pemeriksaan histopatologik, analisis fragmentasi DNA dengan *gel electrophoresis* dan penghitungan indeks apoptosis sel-sel jaringan plasenta, tidak dapat dianalisis dengan baik karena sebagian besar jaringan yang terambil pada saat kuretase dan dikirim sebagai bahan sampel ternyata bercampur antara jaringan desidua, trofoblas dan vilus khorealis, dengan jaringan-jaringan lain seperti endometrium, endoserviks dan gumpalan darah (Sardjono, 2002a).

Dengan hasil yang diperoleh dari penelitian pendahuluan tersebut disadari bahwa untuk mempelajari patogenesis dan pengaruh infeksi *Toxoplasma gondii* terhadap hasil kehamilan tidak dapat dilakukan melalui studi observasional tetapi harus melalui suatu studi eksperimental. Oleh sebab itu maka penelitian ini

dilakukan dengan menggunakan hewan coba mencit *BALB/c* yang dikawinkan secara serentak, diinjeksi takhizoit *Toxoplasma gondii* galur RH dengan dosis bertingkat, kemudian dievaluasi pengaruhnya dalam kurun waktu yang berbeda. Diperkirakan bahwa derajat dan lama infeksi *Toxoplasma gondii*, meningkatkan kadar sitokin IFN γ , ekspresi enzim *caspase-3* serta derajat apoptosis sel-sel desidua dan trofoblas sehingga mempengaruhi hasil kebuntingan mencit.

1.2. Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang yang telah diuraikan di atas, dikemukakan rumusan masalah sebagai berikut :

Apakah infeksi *Toxoplasma gondii* galur RH pada mencit *BALB/c* bunting menurunkan jumlah janin melalui peningkatan kadar IFN- γ , aktivitas *caspase-3* dan apoptosis sel-sel plasenta?

Rumusan masalah tersebut terdiri dari beberapa submasalah yaitu :

- 1.2.1. Apakah dosis dan lama infeksi *Toxoplasma gondii* galur RH pada mencit *BALB/c* bunting, meningkatkan jumlah takhizoit di rongga peritoneum dan kadar IFN- γ plasma, serta menurunkan jumlah janin?
- 1.2.2. Apakah peningkatan jumlah takhizoit *Toxoplasma gondii* galur RH di rongga peritoneum mencit *BALB/c* bunting meningkatkan kadar IFN- γ plasma dan menurunkan jumlah janin?
- 1.2.3. Apakah peningkatan kadar IFN- γ plasma mencit *BALB/c* bunting meningkatkan aktivitas *caspase-3* dan jumlah sel desidua dan trofoblas yang apoptosis serta menurunkan jumlah janin?
- 1.2.4. Apakah peningkatan aktivitas *caspase-3* pada sel-sel desidua dan trofoblas mencit *BALB/c* meningkatkan jumlah sel masing-masing yang apoptosis?

1.2.5. Apakah peningkatan jumlah sel desidua dan trofoblas yang apoptosis menurunkan jumlah janin mencit?

1.3. Tujuan Penelitian

1.3.1. Tujuan umum

Membuktikan bahwa infeksi *Toxoplasma gondii* galur RH pada mencit BALB/c bunting menurunkan jumlah janin melalui peningkatan kadar IFN- γ , aktivitas caspase-3 dan apoptosis sel-sel plasenta.

1.3.2. Tujuan khusus

Membuktikan bahwa :

- 1.3.2.1 dosis dan lama infeksi *Toxoplasma gondii* galur RH pada mencit BALB/c bunting, meningkatkan jumlah takhizoit di rongga peritoneum dan kadar IFN- γ plasma, serta menurunkan jumlah janin.
- 1.3.2.2 peningkatan jumlah takhizoit *Toxoplasma gondii* galur RH di rongga peritoneum mencit BALB/c bunting meningkatkan kadar IFN- γ plasma dan menurunkan jumlah janin.
- 1.3.2.3. peningkatan kadar IFN- γ plasma mencit BALB/c bunting meningkatkan aktivitas caspase-3 dan jumlah sel desidua dan trofoblas yang apoptosis, serta menurunkan jumlah janin
- 1.3.2.4 peningkatan aktivitas caspase-3 pada sel-sel desidua dan trofoblas mencit BALB/c meningkatkan jumlah sel masing-masing yang apoptosis.
- 1.3.2.5 peningkatan jumlah sel desidua dan trofoblas yang apoptosis menurunkan jumlah janin

1.4. Manfaat Penelitian

1.4.1. Manfaat akademik

Hasil penelitian ini akan dapat menambah informasi ilmiah, khususnya tentang.

- 1.4.1.1. mekanisme terjadinya kegagalan kehamilan akibat toksoplasmosis, yaitu melalui peningkatan kadar IFN- γ yang berlebihan, peningkatan aktivitas enzim *caspase 3* dan apoptosis sel-sel plasenta.
- 1.4.1.2. bahwa peristiwa kegagalan kehamilan akibat toksoplasmosis lebih diprakarsai oleh salah satu ataukah oleh ke dua pihak yaitu maternal atau fetal.
- 1.4.1.3. bahwa pengaruh toksoplasmosis terhadap kehamilan selain tergantung kepada saat dan lama terjadinya infeksi, juga dipengaruhi oleh galur *Toxoplasma* yang menginfeksi

1.4.2. Manfaat praktis

- 1.4.2.1. Pola peningkatan kadar IFN- γ plasma pada kehamilan yang terkena toksoplasmosis, dapat digunakan untuk membantu memperkirakan galur *Toxoplasma* yang menginfeksi dan prognosis kehamilan
- 1.4.2.2. Tersedia informasi ilmiah yang lebih dapat dipertanggung jawabkan tentang pengaruh toksoplasmosis terhadap kehamilan, sehingga dapat menjelaskannya kepada masyarakat dengan lebih tepat dan akhirnya dapat mengurangi kecemasan masyarakat yang berlebihan.
- 1.4.2.3. Memperkuat landasan berpikir ilmiah dalam menentukan rencana tindakan dan pengelolaan penderita toksoplasmosis pada kehamilan.



1.4.2.4. Menjelaskan perlunya tindakan preventif sebelum dan selama kehamilan agar terhindar dari infeksi *Toxoplasma* beserta masalah dilematis yang timbul akibat infeksi tersebut.



BAB 2**TINJAUAN PUSTAKA****2.1. *Toxoplasma* dan toksoplasmosis**

Toksoplasmosis merupakan penyakit yang disebabkan oleh parasit *Toxoplasma gondii* yang sampai saat ini senng menjadi topik kajian para peneliti. Hal ini karena toksoplasmosis merupakan penyakit zoonotik yang penularannya mudah, daerah penyebarannya luas, gejalanya tidak spesifik, tetapi menyebabkan kerugian yang cukup besar. Dampak toksoplasmosis tidak hanya dirasakan dalam bidang kesehatan manusia, tetapi juga di bidang sosio ekonomi. Toksoplasmosis pada hewan ternak dapat menyebabkan penurunan produktivitas yang sangat berarti (Remington *et al.*, 1995; Owens, 1998). Infeksi toxoplasma pada manusia dapat menyebabkan kematian terutama individu dengan status kekebalan yang rendah (*immuno-compromised persons*) dan infeksi kongenital pada bayi. Infeksi *Toxoplasma* pada ibu hamil sering dihubungkan dengan berbagai jenis kegagalan kehamilan seperti abortus, lahir mati dan lahir cacat (Kasper and Boothroyd, 1993; Remington *et al.*, 1995; Denney, 1999)

Mekanisme terjadinya kegagalan kehamilan akibat toksoplasmosis sampai sekarang masih belum jelas dan masih menjadi bahan perdebatan para peneliti. Oleh karena itu dapat dimaklumi bahwa peristiwa kegagalan kehamilan akibat toksoplasmosis dapat menjadi masalah psikososial tersendiri bagi wanita yang bersangkutan maupun keluarganya. Ketidak pastian ini dapat mengundang berbagai spekulasi pemikiran di kalangan masyarakat umum sehingga timbul keresahan dan kecemasan yang berlebihan pada ibu-ibu. Kecemasan yang berlebihan inilah yang justru dapat menyebabkan kegagalan kehamilan, dan bukan oleh karena toksoplasmosisnya

2.1.1. Biologi dan daur hidup *Toxoplasma gondii*

Toxoplasma gondii, adalah parasit protozoa dari golongan *coccidia* yang bersifat obligat intra seluler. Dalam daur hidupnya, *Toxoplasma gondii* mempunyai dua generasi yang terjadi secara bergantian (*alternation of generation*), yaitu generasi seksual dan generasi a-seksual. Masing-masing generasi tersebut terjadi di dalam tubuh hospes yang berbeda (*alternation of host*). Generasi seksual, atau siklus entero-epitelial, hanya terjadi di dalam sel-sel epitel usus hospes utama, yaitu kucing dan famili *Felidae* yang lain. Generasi aseksual atau siklus ekstra intestinal, dapat terjadi di dalam sel-sel tubuh hospes utama maupun hospes perantara, seperti burung, ayam dan mamalia selain kucing, seperti tikus, kambing, babi dan juga manusia (McCabe, 1990. Kasper and Boothroyd, 1993, Kasper, 1998, Dubey, 1998)

Toxoplasma gondii memiliki tiga bentuk atau stadium, yaitu 1) bentuk trofozoit atau takhizoit, 2) bentuk kista atau bradizoit dan 3) bentuk ookista.

2.1.1.1. Takhizoit

Tachyzoite (takhizoit) berasal dari bahasa Yunani "*tachos*" yang berarti cepat. Istilah takhizoit ini diperkenalkan oleh Frenkel (1973) untuk menyebut stadium parasit yang sedang bermultiplikasi cepat di dalam sel. Takhizoit juga dipakai untuk menggantikan istilah trofozoit/*trophozoite* (*trophicos* = makanan), yaitu bentuk vegetatif yang aktif. Selain itu takhizoit juga disebut *endozoite* karena ia bermultiplikasi secara *endodyogeny*. Takhizoit berbentuk oval atau bulan sabit, dengan ujung anterior runcing, ujung posterior tumpul, ukuran panjang 4-6 μm dan lebar 2-4 μm (Gambar 2.1.1. A, B, C dan D)

nucleus dan sebagainya. Skema tersebut diperoleh dari gambaran elektron mikroskop (Dubey, 1998). Bentuk parasit di dalam sel makrofag dan cairan peritoneum nampak pada Gambar 2.1.2. A dan B. (Pappas and Wardrop, 2001).

Takhizoit tidak mempunyai organ gerak seperti *cilia*, *flagella* ataupun *pseudopodia*, tetapi ia dapat bergerak dengan cara menggelinding (*gliding*), melentur (*flexing*), bergelombang (*undulating*) dan berputar (*rotating*). Fungsi organella seperti *conoid*, *rhoptry*, *micropore* dan *miconeme* belum sepenuhnya diketahui, tetapi mungkin mereka berperan dalam proses penetrasi ke dalam sel hospes dan menciptakan lingkungan yang cocok untuk pertumbuhan dan perkembangan parasit di dalam sel. *Conoid* dapat berputar, miring, memanjang dan memendek ketika parasit melakukan penjajagan terhadap sel hospes sebelum penetrasi. *Rhoptry* mempunyai fungsi sekresi yang berhubungan dengan proses penetrasi sel, dengan mensekresi isinya berupa enzim proteolitik, melalui *plasmalemma* sedikit di atas *conoid* (Dubey, 1998).

Takhizoit memasuki sel hospes secara aktif atau melalui proses fagositosis. Setelah berada di dalam sel, takhizoit berubah bentuk menjadi lonjong, dan diliputi oleh vakuola parasitoforus (PV) yang berasal dari sel parasit dan sel hospes sendiri. Takhizoit dapat bermultiplikasi langsung secara aseksual dengan membelah diri (*simple binary fission = endodyogeny*), hanya bila berada di dalam sel. Pada hospes perantara, pembelahan dapat terjadi pada semua jenis sel; tetapi pada kucing proses ini hanya terjadi pada sel-sel selain epitel usus. Takhizoit tidak dapat hidup dalam lingkungan kering, dingin atau beku, dan oleh adanya pengaruh enzim-enzim pencernaan. Bentuk ini mati dalam beberapa menit oleh pengaruh asam lambung atau cairan pencernaan yang lain, atau dapat bertahan paling lama sekitar 3-6 jam (Remington, 1995, Dubey, 1998).

Bentuk takhizoit ditemukan pada stadium infeksi akut, di mana mereka memasuki berbagai jenis sel yang berinti dalam jaringan tubuh mamalia. Setelah memasuki sel tubuh hospes, organisme ini bermultiplikasi di dalam vakuola, rata-rata setiap 4-6 jam. Secara *in vivo*, sebagian besar takhizoit berkelompok secara acak namun tak jarang dijumpai bentuk *rosette*. Hal ini karena siklus *endoyogeni* yang tidak simultan, atau pada saat lain terjadi pembelahan yang serentak. Pada galur yang telah beradaptasi dalam kultur sel, parasit di dalam vakuola dapat membelah secara hampir bersamaan (Dubey, 1998). Selanjutnya bila telah terisi penuh oleh takhizoit, sel hospes pecah dan keluarlah organisme-organisme baru yang menginvasi sel-sel di sekitarnya atau mengalami fagositosis. Kemampuan dan kecepatan invasi dan pertumbuhan parasit di dalam sel hospes bervariasi, tergantung kepada galur *Toxoplasma gondii* dan jenis sel yang diinvasi. Untuk keperluan penelitian di laboratorium, organisme ini dapat dikembang biakkan di dalam rongga peritoneum mencit, kultur jaringan sel mamalia atau telur ayam yang telah dibuahi (Remington, 1995; Dubey, 1998).

2.1.1.2. Kista (bradizoit)

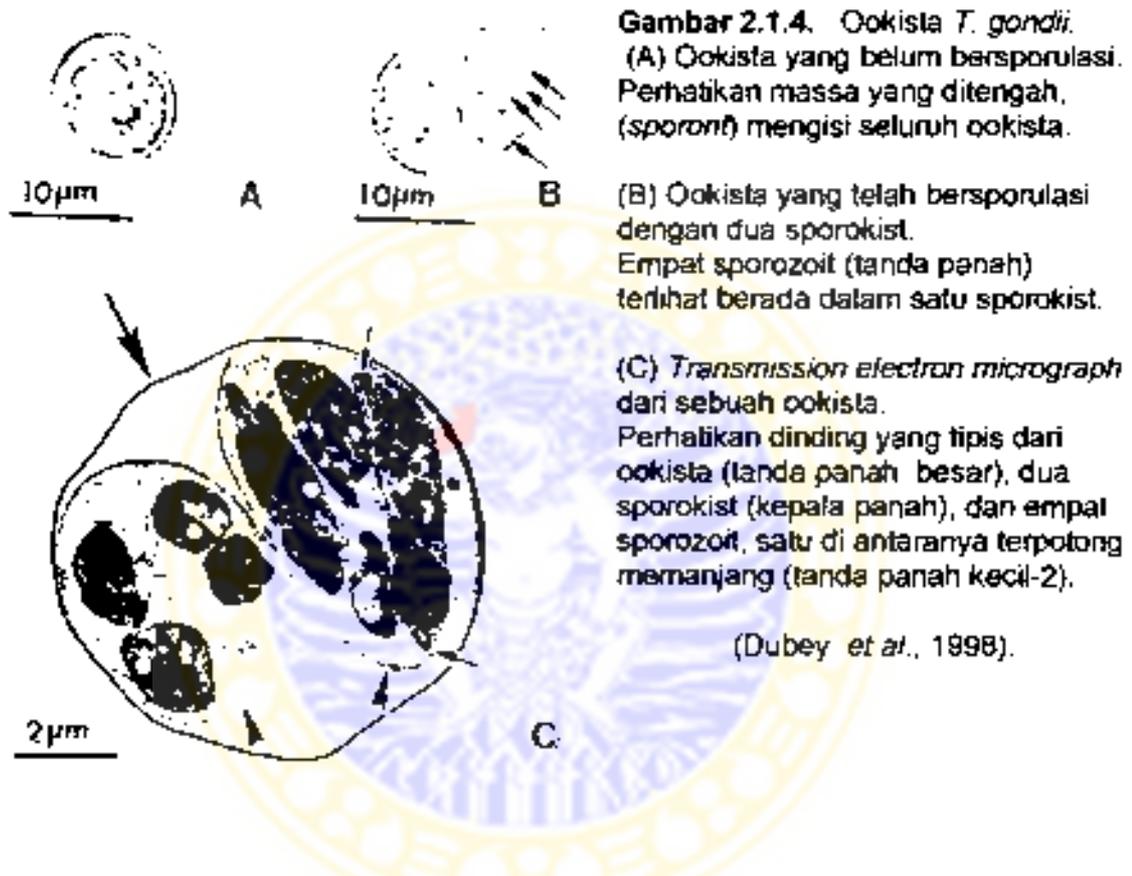
Kista atau sistozoit (*cystozoite*), adalah bentuk resisten yang dapat tumbuh di dalam sel jaringan hospes perantara, terutama otak, otot jantung dan juga otot bergaris. Istilah "bradyzoite" berasal dari bahasa Yunani (*brady* = lambat), untuk menyebut organisme yang melakukan multiplikasi secara lambat di dalam sel. Kista terbentuk paling awal setelah minggu pertama dari awal infeksi, dan dapat tetap bertahan selama kehidupan hospes berlangsung. Hal ini disebabkan karena dinding kista terdiri dari lapisan yang berasal dari jaringan tubuh hospes sendiri, sehingga tidak dikenali oleh sistem kekebalan hospes. Parasit di dalam kista bermultiplikasi secara *endodyogeny*, sehingga ukuran kista sangat bervariasi.

1998). Apabila kista janjian termakan, maka oleh pengaruh asam lambung dan enzim-enzim pencernaan lain, dinding kista pecah dalam waktu sekitar 2 - 6 jam, sehingga cukup memberi kesempatan bagi organisme untuk tetap hidup selama proses pencernaan makanan di dalam usus berlangsung. Apabila dinding kista pecah, maka isi kista keluar dan takhizoit kembali beredar bersama aliran darah serta dapat memasuki sel-sel organ tubuh yang lain. Pembekuan dan pencairan, pemanasan dan pengawetan dengan pengeringan, merusak bentuk kista parasit, tetapi organisme dalam bentuk ini dapat tetap hidup pada suhu 4°C sampai dengan 2 bulan. Kista janjian akan kehilangan kemampuan hidupnya bila suhu di dalamnya mencapai 65°C atau -12°C (Remington, 1995).

2.1.1.3. Ookista

Ookista adalah bentuk resisten di luar sel, dihasilkan dari siklus skisogoni yang hanya terjadi di dalam lumen usus kucing, lalu dikeluarkan bersama tinja. Kucing dapat menghasilkan ookista setelah makan salah satu dari tiga bentuk infeksi dari *Toxoplasma gondii*, yaitu takhizoit, bradizoit ataupun ookista. Pada kucing, periode prepaten sejak tertelannya parasit sampai terbentuknya ookista bervariasi antara 3-10 hari setelah tertelan kista jaringan, 19-48 hari setelah tertelan takhizoit dan 21-40 hari setelah tertelan ookista. Gametosit terbentuk di dalam usus halus kucing sejak hari 3-15 setelah infeksi. Fertilisasi terjadi antara mikrogamet matang yang keluar dari sel epitel ke dalam lumen usus kemudian menemui makrogamet yang sebagian besar berada di dalam epitel, membentuk sigot. Setelah itu tidak ada lagi pertumbuhan di dalam usus kucing. Puncak produksi ookista terjadi di antara hari ke 5 dan 8. Selama fase akut, seekor kucing yang terinfeksi oleh *Toxoplasma*, mampu memproduksi sampai 10 juta ookista

per hari. Ketika keluar dari usus, ookista belum bersporulasi, berbentuk bulat ukuran $10 \times 12 \mu\text{m}$, berisi massa padat yang berkembang menjadi 2 (dua) sporoblas, dan setelah matang menjadi sporokist, bentuknya berubah menjadi lonjong, berukuran $11-14 \times 9-11 \mu\text{m}$ dan berisi 4-8 sporozoit (Gambar 2.1.4.).



Bergantung kepada suhu dan kondisi tanah, sporulasi terjadi dalam waktu yang bervariasi antara 1-21 hari. Ookista yang belum matang ini sudah dapat berubah menjadi bentuk infeksi dalam waktu 2-3 hari pada suhu sekitar 24°C , 5-8 hari pada suhu 15°C dan 14-21 hari pada 11°C . Setelah bersporulasi, ookista *Toxoplasma* dapat bertahan di atas tanah sebagai bentuk infeksi sampai lebih dari 1 tahun (McCabe, 1990, Kasper and Boothroyd, 1993; Remington, 1995, Kasper, 1998)

2.1.1.4. Transmisi antar hospes

Transmisi parasit *Toxoplasma gondii* dapat terjadi antar hospes melalui berbagai mekanisme. Dalam siklus hidup *Toxoplasma gondii*, manusia bertindak sebagai hospes perantara, seperti organisme lain selain kucing, seperti tikus, ayam, babi, kambing dan binatang temak yang lain (Gambar 2.1.5). Pada manusia, infeksi sering terjadi melalui mulut, baik karena tertelan bentuk kista yang terkandung dalam otot atau daging ayam, kambing atau temak lain yang kurang sempurna memasaknya, juga melalui sayuran mentah atau makanan yang terkontaminir ookista. Walaupun jarang, transmisi juga dapat terjadi dalam bentuk takhizoit, misalnya karena kecelakaan kerja di laboratorium, melalui transfusi darah atau transplantasi organ. Toksoplasmosis kongenita pada bayi dapat terjadi bila seorang ibu terkena infeksi pada saat kehamilan sedang berlangsung. Disebutkan bahwa hal tersebut terjadi melalui transmisi trofozoit lewat jaringan plasenta (Gambar 2.1.5.) Namun disebutkan pula bahwa transmisi pada bayi yang dikandung sehingga menimbulkan toksoplasmosis kongenita pada umumnya hanya terjadi pada kasus-kasus infeksi primer (Remington, 1990; McCabe, 1990; Kasper and Boothroyd, 1993, Kasper, 1998; Dubey, 1998; Pappas and Wardrop, 2001).

2.1.2. Perlekatan dan perkembangan parasit di dalam sel hospes

Proses perlekatan dan penetrasi berbagai bentuk dari *Toxoplasma gondii* (zoites = takhzoit, bradizoit, sporozoit dan merozoit) ke sel hospes, pada dasarnya sama dengan parasit golongan coccidia yang lain. Peristiwa-peristiwa mekanik yang terjadi dalam proses perlekatan dan perkembangan tersebut meliputi : 1) *gliding* dari zoite, 2) *probing* /pengenalan sel hospes dengan ujung conoid dan zoite, 3) *indenting* atau perlekukan dan *plasmalemma* sel hospes, 4) pembentukan ikatan pergerakan yang bergerak ke arah posterior seiring dengan masuknya parasit ke sel hospes, dan 5) *partially exocytosing*keluarnya sebagian *miconeme*, *rhoptries* dan granula-granula padat. Zoites *Toxoplasma gondii* dapat memasuki semua jenis sel dan berbagai jenis hospes. Hal ini menunjukkan bahwa dalam proses perlekatan dan penetrasi parasit ke dalam sel-sel hewan pada umumnya melibatkan berbagai jenis reseptor biokimiawi. Reseptor-reseptor sel hospes yang mengandung laminin, lektin dan SAG1 juga terlibat di dalam proses perlekatan dan penetrasi takhzoit *Toxoplasma gondii*. Namun demikian, zoite *Toxoplasma gondii* juga dapat melekat tanpa melalui mekanisme yang diperantarai reseptor (*receptor-mediated penetration*), yaitu melalui proses endositosis (Dubey et al .. 1998).

Setelah takhzoit masuk ke dalam sel, ia segera dikelilingi oleh suatu membran yang berasal dari protein-protein hospes. Membran itu dipersiapkan untuk menjadi membran vakuola parasitoforus (*PVM = Parasitophorous Vacuole Membrane*) dan sejumlah protein-protein lain yang berhubungan dengannya, termasuk protein-protein *rhoptry* yaitu ROP1, ROP2, ROP3, ROP4 dan ROP7. ROP2 terletak pada sisi sitoplasma dari PVM sel hospes, menunjukkan bahwa

ia berperan pada komunikasi biokimiawi antara hospes dengan parasit. Dalam waktu beberapa menit setelah penetrasi, takhizoit memodifikasi bentuk baru dari PV dan PVM dengan protein parasit dan bentuk baru TMN (*tubulovesicular membranous network*) di dalam PVM. PVM menyusun struktur pori yang memungkinkan molekul-molekul bermuatan sampai dengan 1200 kDa untuk berdifusi dua arah antara PV dan sitoplasma sel hospes. Protein-protein bergranula padat (GRA) disekresikan ke dalam PV setelah penetrasi takhizoit, dengan GRA 3 dan GRA5 berada di atas PVM dan GRA1, GRA2, GRA4 dan GRA6 berhubungan dengan TMN. Modifikasi seperti yang diuraikan di atas, menciptakan lingkungan yang cocok bagi parasit di dalam sitoplasma dan memungkinkan terjadinya replikasi parasit (Dubey *et al.*, 1998).

2.1.3. Virulensi dan daya patogenik *Toxoplasma gondii*

Sampai saat ini telah dikenal berbagai jenis/galur *Toxoplasma gondii*, dan salah satu hal yang menarik adalah adanya perbedaan virulensi antara galur-galur tersebut. Faktor-faktor utama yang menentukan perbedaan virulensi tersebut banyak yang masih belum diketahui secara pasti, walaupun ciri-ciri dan petanda genetik yang berhubungan dengan patogenisitas *Toxoplasma gondii* maupun kepekaan hospes, telah dapat diidentifikasi (Nischik, *et al.*, 2002). Uraian adanya variasi genetik di antara isolat *Toxoplasma gondii* mula-mula muncul bukan hanya karena adanya perbedaan patogenisitas terhadap mencit Swiss tetapi juga karena manifestasi klinis pada manusia yang sangat bervariasi, dan tidak dapat dijelaskan melalui mekanisme status kekebalan hospes. Sehubungan dengan luasnya distribusi geografis, jenis hospes yang

sangat bervariasi dan kapasitasnya untuk berkembang biak secara seksual maka diduga ada polimorfisme genetik yang luas (Dardé, 1996)

Melalui analisis isoenzim terhadap berbagai galur *Toxoplasma gondii* menghasilkan sedikit lima *zymodeme* (Dupouy-Camet, 1997). Isolat galur yang mempunyai virulensi tinggi terhadap mencit misalnya galur RH, adalah termasuk *zymodeme* 1 (Z-1) atau Z-5, sedangkan isolat yang menyebabkan infeksi kronik, termasuk Z-2, Z-3 atau Z-4. Contoh galur yang termasuk Z-2 misalnya *Prugnnaud*, *76K*, *Me49*, *Beverly*; dan Z-3 misalnya adalah *C56*. Isolat dan kasus toksoplasmosis kongenita pada manusia ternyata termasuk kelima-limanya. Menurut data akhir yang diperoleh dari hasil analisis *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP) menunjukkan bahwa *Toxoplasma gondii* terdiri dari tiga garis keturunan (*clonal lineaged designated*), yaitu tipe I, II dan III. Tipe I berhubungan dengan (Z-1), tipe II dengan Z-2 dan Z-4, dan tipe III dengan Z-3. Lebih dari 70% dari kasus pada manusia berhubungan dengan galur dan tipe II. Galur tipe II ini juga lebih banyak ditemukan pada binatang yang dikonsumsi sehari-hari, seperti babi dan kambing. Virulensi yang tinggi pada mencit sangat terbatas diamati pada galur tipe I, menunjukkan bahwa determinan genetik sangat berperan dalam patogenesis penyakit (Dupouy-Camet, 1997).

Dan analisis isoenzim yang dilakukan oleh Dardé (1996) terhadap 61 isolat *Toxoplasma* dengan menggunakan 15 enzim, ditemukan sebanyak 11 *zymodeme* yang juga dapat dibagi menjadi tiga kelompok. Kelompok pertama meliputi isolat Z-3, Z-7, Z-9 dan Z-10, yaitu yang *avirulent* (A) dan *intermediate virulent* (I). Kelompok kedua terdiri dari Z-2, Z-4, Z-8 dan Z-11, yang sebagian besar adalah *avirulent* (A), sedangkan Z-1 berhubungan erat dengan Z-5 dan Z-6 yang semuanya *virulent* terhadap mencit (Gambar 2.1.6)



Gambar 2.1.6. Dendrogram dari 11 zymodeme *Toxoplasma gondii* (Dardé, 1996)

Ternyata memang ada hubungan antara polimorfisme genetik dengan virulensi terhadap mencit. Selain itu juga ditemukan adanya perbedaan antigenik yang mula-mula dilaporkan di antara tiga galur utama. Tiga antigen permukaan utama (P40, P30 dan P22) nampak berbeda di antara galur yang virulen terhadap mencit (RH) dan dua galur yang non virulen (galur P dan C). Antibodi monoklonal terhadap P22 dan P30 tidak membunuh galur P dan C seperti pada galur RH (Dardé, 1996).

Berdasarkan hal-hal tersebut maka ditegaskan bahwa secara umum berbagai galur *Toxoplasma* dapat dibagi menjadi tiga golongan, yaitu yang mempunyai virulensi tinggi, menengah, dan rendah atau tidak virulen. Virulensi *Toxoplasma gondii* dapat diukur dengan menghitung waktu yang dilewati sejak dilakukan inokulasi sampai hewan coba mati, atau persentase hewan coba yang mati akibat infeksi tersebut. Infeksi akut dengan galur type I (virulen) dapat

menyebabkan kematian mencit dalam waktu relatif singkat, yaitu sekitar 6-10 hari; sedangkan infeksi galur non-virulen dengan dosis yang bervariasi antara 10^2 - 10^5 menyebabkan kematian dalam waktu 10 sampai 20 hari. Disebutkan juga bahwa virulensi parasit dapat meningkat setelah dilakukan pasase berulang (Guo and Johnson, 1996). Sebagai contoh, virulensi *Toxoplasma gondii* galur ME49, salah satu galur yang non-virulen, meningkat dan $LD50 > 10^5$ menjadi $LD50 > 10^2$ setelah beberapa kali pasase (Sibley and Howe, 1996). Inokulasi dengan galur RH kepada mencit menyebabkan kematian dalam waktu 17-21 hari bila inokulan berasal dari pasase pertama, 7-8 hari bila dari pasase ke dua dan 3-5 hari bila dari pasase ke tiga dan seterusnya (Evans, 1992).

Berbagai jenis dan galur hewan coba juga ikut berperan terhadap tingkat virulensi parasit, karena mereka menunjukkan kepekaan dan daya tahan yang berbeda terhadap infeksi *Toxoplasma gondii*. Tikus dikenal sebagai salah satu hewan coba yang resisten dibandingkan dengan mencit. Mencit galur BALB/c dikenal resisten dibandingkan mencit galur yang lain seperti C57BL/6 atau galur Swiss-Webster (Roberts and Alexander, 1992; Jensen *et al.*, 1998; Dubey *et al.*, 1999; Kobayashi *et al.*, 1999). Pada percobaan Zenner (1993) dengan menggunakan tiga galur *Toxoplasma gondii* yang berbeda, yaitu RH, 76K dan Prugniaud yang diinfeksi pada tikus didapatkan angka infeksi pada fetus masing-masing adalah 58,2% pada RH, 62,6% pada Prugniaud dan 35,2% pada galur 76K. Perbedaan tipe virulensi ini mungkin dapat dihubungkan dengan perbedaan permukaan reseptor atau antigen, yang sampai saat ini peranannya dalam patogenesis terjadinya toksoplasmosis belum seluruhnya dapat dijelaskan (Zenner, 1993; Dupouy-Camet, 1997).

2.1.4. Respon hospes dan patologi pada infeksi *Toxoplasma gondii*

Dalam perjalanan penyakit di tubuh hospes, baik pada manusia maupun hospes yang lain, setelah terjadi infeksi primer dengan *Toxoplasma gondii*, pada prinsipnya akan terjadi tiga tahap penting, yaitu 1) tahap parasitemia, lalu diikuti dengan 2) tahap pembentukan antibodi sebagai salah satu rangkaian reaksi dari sistem kekebalan tubuh, kemudian disusul dengan 3) tahap khronis. Bila kista berisi bradizoit atau ookista berisi sporozoit termakan oleh manusia, di lumen usus parasit keluar dan kista melalui proses digestif hanya dalam waktu beberapa menit. Di situ parasit melakukan transformasi morfologis menjadi takhizoit yang bersifat invasif, yang mampu menginfeksi dan melakukan replikasi di dalam semua sel kecuali sel darah merah. Di dalam sel, organisme ini mampu untuk terus melakukan multiplikasi, sehingga sitoplasma dipenuhi oleh takhizoit. Akibatnya, suatu saat sel akan pecah dan mengeluarkan individu organisme baru yang apabila tidak ditelan oleh sel-sel fagosit, akan menginvasi sel yang berada di dekatnya (Kasper and Boothroyd, 1993; Remington, 1995).

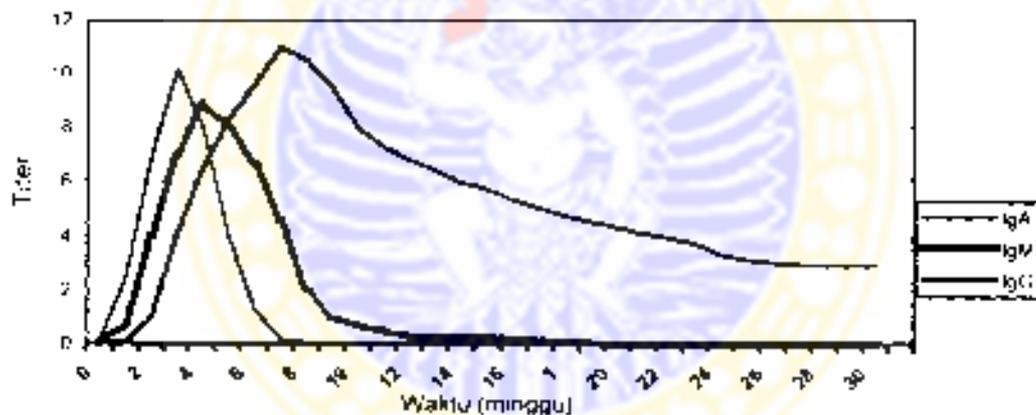
Pada individu yang normal, kejadian tersebut akan merangsang sistem kekebalan tubuh. Respon dan sistem kekebalan tubuh yang mula-mula terjadi adalah pengenalan (*recognition*), yaitu benda patogen yang berasal dari luar tubuh dikenal sebagai benda asing. Reaksi awal terhadap benda asing tersebut dilakukan oleh sel-sel fagosit sebagai bagian dari sistem kekebalan non spesifik, disusul oleh respon sistem kekebalan spesifik yang kemudian akan teraktivasi untuk mengatasi infeksi tersebut (Hyde, 1990; Kasper and Boothroyd, 1993). Respon kekebalan non spesifik mempunyai peran penting pada awal induksi dari sitokin-sitokin proinflamasi. Limfosit T, sel NK dan makrofag yang teraktivasi merupakan bagian dari sistem kekebalan non spesifik yang penting dan terlibat

langsung dalam respon kekebalan terhadap *Toxoplasma* (Kasper, 1998; Denney, 1999; Abbas, 2000). Sel-sel NK mampu melisis sel-sel yang terinfeksi parasit dan mensekresi sitokin, suatu efektor yang merupakan kunci penting dalam mekanisme kontrol terhadap infeksi *Toxoplasma* akut (Hunter, 1994a). Percobaan pada mencit yang diinfeksi oleh *Toxoplasma gondii* menunjukkan bahwa pada infeksi akut, makrofag mampu menghambat replikasi parasit melalui pelepasan berbagai mediator. Berbagai kajian menunjukkan bahwa sel-sel dendritik, neutrofil dan makrofag bereaksi langsung terhadap antigen parasit dengan memproduksi IL-12, TNF α dan IFN γ (Bliss, 1999; Denney, 1999; Mordue, 2001). Pada infeksi kronis, makrofag melepaskan peroksida aktif lebih besar beberapa kali lipat dan normal dan mengakibatkan munculnya aktivitas toksoplasmidal (Kasper and Boothroyd, 1993; Hunter, 1994b). Pada penelitian lebih lanjut ditemukan fakta bahwa bila parasit tidak difagosit dan masuk ke dalam makrofag dengan cara penetrasi aktif pada saat respon kekebalan non spesifik, justru mampu melanjutkan replikasi di dalam makrofag (Gambar 2.1 2 A.). Kemampuan parasit masuk ke dalam makrofag dan limfosit ini memudahkan terjadinya penyebaran parasit secara hematogen (Channon, 1996; Kasper, 1998; Denney, 1999).

Tahap berikutnya adalah tahap pembentukan antibodi. Pada individu yang normal, infeksi *Toxoplasma gondii* akut akan menimbulkan respon kekebalan protektif. Parasit yang masuk ke dalam mukosa usus akan menyebabkan produksi antibodi IgA. Antibodi IgA ini spesifik terhadap P30, suatu protein permukaan mayor pada *Toxoplasma gondii*. Antibodi ini merupakan bagian dari sistem kekebalan humoral yang pertama kali muncul, yang potensial sebagai modulator terhadap efek protektif (Kasper, 1998; Gandahusada, 1999).

Toxoplasma gondii juga menginduksi sel-sel limfosit B untuk melakukan sekresi antibodi serum IgM dan IgG. Kadar IgM serum meningkat beberapa hari setelah infeksi primer dan mencapai puncaknya setelah lebih kurang dua minggu, kemudian menurun dalam waktu 2-3 bulan. IgM dapat bertahan di dalam darah sampai beberapa bulan, bahkan lebih dari setahun (Gambar 2.1.7.).

Antibodi IgG spesifik juga mulai diproduksi, dan dapat dideteksi di darah perifer beberapa hari setelah munculnya IgM. Kadar IgG serum meningkat dan mencapai puncaknya dalam waktu lebih kurang dua bulan, dan dapat bertahan sampai bertahun-tahun dengan titer yang tinggi, kemudian turun secara bertahap, dan dapat ditemukan seumur hidup dalam titer yang rendah (Gambar 2.1.7). (Remington, 1990, Kasper, 1998, Gandahusada, 1999).



Gambar 2.1.7. Respon kekebalan hospes pada toxoplasmosis (Gandahusada, 1999)

Suatu hal yang penting untuk diketahui bahwa ternyata *Toxoplasma gondii* dapat mengembangkan sejumlah mekanisme yang menyebabkan dia dapat bertahan hidup dan melawan respon kekebalan hospes yang ditimbulkannya. Juga diketahui bahwa persistensi *Toxoplasma gondii* di dalam sel merupakan akibat dan tidak terstimulasinya reaksi oksidatif oleh keberadaan parasit (Kasper

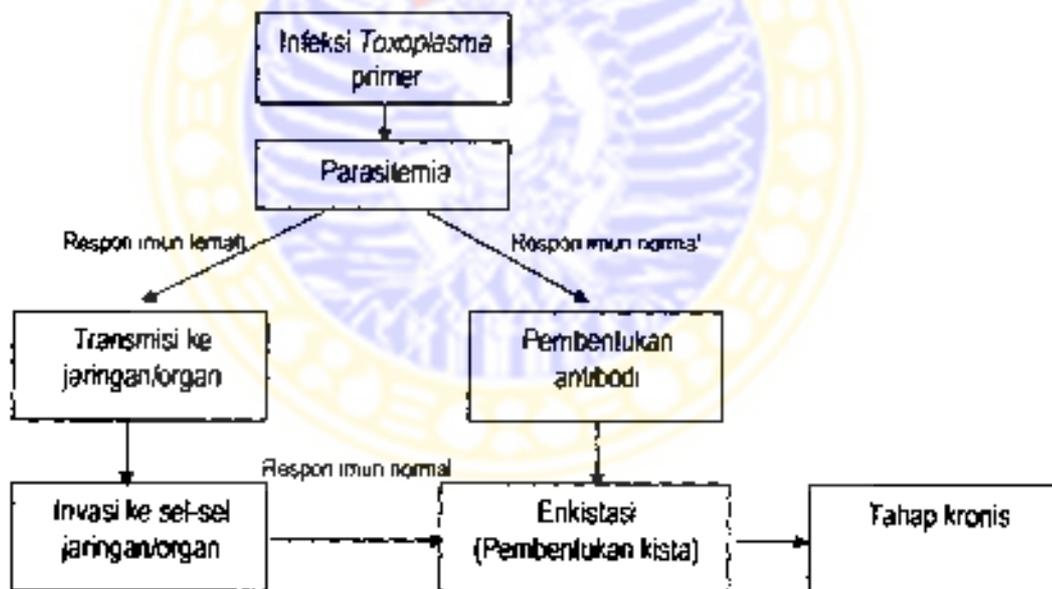
and Boothroyd, 1993) *Toxoplasma gondii* juga mampu mempertahankan diri dan efek fagositosis dan oksidatif makrofag yang dapat menyebabkan kematian parasit, melalui pembentukan protein matriks ekstraseluler berupa *laminin*, yang menyelubungi dirinya sebelum melakukan invasi ke dalam sel (McKerrow, 1997). Kontak antara tachizoit *Toxoplasma gondii* dengan monosit yang memicu pelepasan *soluble factors* yang dapat menekan respon proliferasi limfosit, diduga juga diinduksi oleh protein *laminin* ini (Channon, 1996, Dubey *et al.* 1998). Hal ini dapat terjadi karena tachizoit yang mengadakan kontak dengan membran sel akan menginduksi perubahan topologi membran melalui sekresi struktur khusus parasit yang disebut *rhoptry*. Parasit ini masuk ke dalam sel melalui *moving membrane junction* dan kemudian membentuk vakuola parasitoforus di dalam sitoplasma. Vakuola tersebut mempunyai struktur khusus yang mungkin merupakan hasil sekresi dan *rhoptry* yang berisi protein membran dari hospes, sehingga tidak dikenali oleh sistem kekebalan hospes sendiri (Gambar 2.1.8.) Hal inilah yang menyebabkan vakuola beserta parasit yang berada di dalamnya dapat terhindar dari asidifikasi atau fusi dengan lisosom sel hospes, dan proses masuk ke tahap kronis. Kista jaringan mulai terbentuk pada hari ke tujuh setelah infeksi, dan sering ditemui di jaringan otak dan otot (Kasper and Boothroyd, 1993; McKerrow, 1997, Kasper, 1998).



Gambar 2.1.8. *Transmission electron micrograph* dan tachizoit *T. gondii* yang sedang melakukan penetrasi ke neutrofil dalam peritoneum mencit

(Dubey *et al.* ., 1998)

Singkatnya pada setiap infeksi *Toxoplasma* pada hospes akan terjadi serangkaian proses yang berurutan. Infeksi yang terjadi baik secara oral maupun inokulasi, akan diikuti oleh parasitemia yang dilanjutkan dengan transmisi dan invasi parasit ke seluruh sel jaringan tubuh. Bila status kekebalan hospes rendah atau lemah maka parasit akan bermultiplikasi di dalam sel-sel jaringan tubuh, dan kondisi ini akan terus berlanjut. Sebaliknya, pada individu yang normal maka proses ini akan merangsang sistem dan mekanisme kekebalan tubuh, yang dilanjutkan dengan pembentukan antibodi. Dalam kondisi seperti ini proses infeksi akan menuju ke tahap khronis, dimana parasit tetap berada di dalam sel-sel jaringan tubuh dan berada dalam bentuk kista. (Gambar 2.1.9) (Kasper and Boothroyd, 1993; Remington *et al.*, 1995; Kasper, 1998).



Gambar 2.1.9. Bagan tahap-tahap yang terjadi pada infeksi *Toxoplasma* primer.

Setelah tahap parasitemia, bila sistem kekebalan tubuh masih lemah atau belum terbentuk maka proses akan berlanjut ke fase akut. Bila sistem kekebalan berjalan normal atau meningkat, maka parasit akan membentuk kista dalam jaringan dan proses akan menuju ke tahap khronis. (Kasper and Boothroyd, 1993; Remington *et al.*, 1995; Kasper, 1998)

2.2. Fisiologi dan Imunologi Kehamilan

Kehamilan adalah suatu fenomena fisiologik yang berawal dari pertemuan sel telur yang telah masak yang dibuahi oleh sel sperma, menghasilkan *zygote* atau konseptus, dan selanjutnya tumbuh menjadi embrio atau janin. Secara imunologik, pada hakikatnya embrio merupakan benda asing atau parasit, yang hidup sepanjang masa kehamilan berlangsung. Sepatutnya kehadiran parasit ini mengalami reaksi penolakan dari tubuh ibu, tetapi kenyataannya kehamilan tetap berlangsung hingga bayi lahir dan lahir normal. Reaksi penolakan baru terjadi bila ada hal-hal yang luar biasa, misalnya pada abortus spontan. Fenomena penerimaan dan penolakan konseptus ini cukup menarik perhatian para ahli sejak lebih dari setengah abad yang lalu (Cunningham *et al.*, 1997; Hilla, 1997; Beer and Kwak Kim, 1998, Bowen, 2001).

Selama kehamilan berlangsung, embrio terus tumbuh dan berkembang. Untuk itu ia memerlukan suatu organ yang mempunyai sistem peredaran darah dengan susunan dan sistem yang sedemikian rupa, sehingga dapat memenuhi kebutuhan nutrisi dan membuang bahan-bahan sisa. Organ tersebut sekaligus juga merupakan jalinan hubungan perantara (*interface*) yang efisien antara sistem peredaran darah milik embrio sendiri dengan milik ibunya. Jalinan hubungan tersebut adalah plasenta. Walaupun secara anatomis sel-sel embrio dengan sel-sel ibu adalah terpisah, namun sebenarnya antara keduanya masih saling berhubungan melalui organ yang disebut plasenta ini. Istilah ini berasal dari bahasa Latin, dan pertama kali diperkenalkan oleh Realdus Columbus pada tahun 1559. Plasenta merupakan organ spesifik dan unik, yang hanya dimiliki oleh organisme dari golongan mamalia (Beckerman, 1997; Bowen, 2001, Benirschke, 2002).

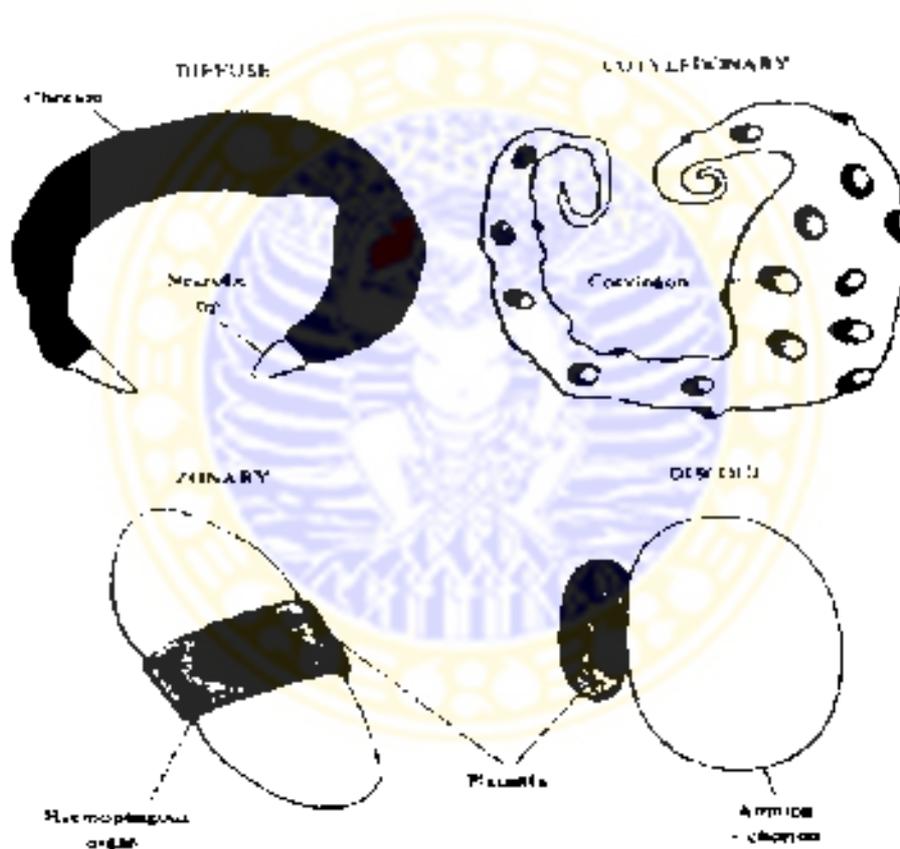
2.2.1. Jenis plasenta dan bagian-bagian yang menyusunnya

Plasenta adalah organ istimewa, terdiri dari sel-sel dengan struktur dan fungsi spesifik yang menghubungkan embrio dengan uterus melalui rangkaian pembuluh darah yang tersusun rapi, sehingga dapat menjamin kehidupan embrio. Walaupun hanya berukuran pendek, organ ini mutlak diperlukan karena selain berfungsi nutritif dan metabolik menggantikan organ-organ paru, ginjal, usus dan liver bagi embrio, ia juga memproduksi berbagai jenis protein dan hormon steroid yang mengatur aktivitas fisiologis kehamilan. Plasenta juga merupakan jaringan yang mempunyai potensi kekebalan (Cross, 1994; Beckerman, 1997; Bowen, 2001).

Plasenta mempunyai pola struktur dan fungsi yang bersifat umum, tetapi pada berbagai jenis mamalia ada beberapa perbedaan pokok antar spesies tertentu. Atas dasar struktur anatomi dan histologi yang menyusunnya, jenis plasenta dapat dibagi menurut: 1) bentuk makroskopik dari plasenta dan penyebaran tempat-tempat yang menghubungkan membran fetal dengan endometrium (*contact points*), dan 2) jumlah lapisan jaringan yang ada di antara sistem vaskuler maternal dan fetal. (Firth, 1999; Bowen, 2001).

Berdasarkan bentuk plasenta dan *contact points* antara komponen fetal dengan maternal (endometrium), dikenal ada 4 bentuk plasenta, yaitu bentuk *diffuse*, *cotyledonary*, *zonary*, dan *discoid*. (Gambar 2.2.1. dan Tabel 2.2.1.) Pada plasenta bentuk *diffuse*; hampir seluruh permukaan *allantochorion* terlibat dalam pembentukan plasenta. Bentuk plasenta seperti ini didapatkan pada kuda dan babi. Pada bentuk *cotyledonary*, ditemukan plasenta dengan beberapa tempat perlekatan yang disebut *cotyledon* yang berjumlah banyak, tersebar, dan terjadi oleh adanya interaksi antara *allantochorion* dengan endometrium. Bagian fetal dari plasenta jenis ini disebut *cotyledon*, sedangkan tempat melekat di sisi

allantochoanon dengan endometrium. Bagian fetal dari plasenta jenis ini disebut *cotyledon*, sedangkan tempat melekat di sisi maternal disebut *caruncle*, dan kompleks *cotyledon-caruncle* disebut *placentome*. Tipe plasenta ini dijumpai pada hewan jenis ruminansia. Bentuk *zonary*, yaitu plasenta yang berbentuk jaringan semacam sabuk yang utuh atau sebagian, yang seolah olah membungkus fetus, dimiliki oleh anjing dan kucing. Bentuk *discoid*, yaitu plasenta tunggal yang berbentuk cakram, dijumpai pada primata dan rodentia (Renfree, 1996, Bowen, 2001)



Gambar 2.2.1 Pembagian plasenta berdasarkan bentuk dan tempat perlekatan (dikutip dari Renfree, 1996)

Tabel 2.2.1. Pembagian jenis plasenta berdasarkan bentuk dan tempat perlekatan antara komponen maternal dan fetal (Renfree, 1982; Bowen, 2000)

Jenis plasenta	Tempat perlekatan	Contoh organisme
<i>Diffuse</i>	Seluruh permukaan <i>allantochorion</i> terlibat dalam pembentukan plasenta	Babi, kuda
<i>Cotyledonary</i>	Berupa pulau-pulau <i>cotyledon</i> yang banyak dan tersebar di tempat-tempat yang disebut <i>placentome</i>	Ruminansia
<i>Zonary</i>	Berupa jaringan yang berbentuk seperti sabuk yang membungkus fetus	Anjing, kucing, gajah, beruang
<i>Discoid</i>	Berbentuk cakram, tunggal	Primata, rodentia

Selanjutnya, berdasarkan struktur jaringan yang menyusun plasenta, secara mikroskopis ada 3 jenis lapisan fetal, yaitu 1) lapisan endotel sepanjang kapiler allantois, 2) jaringan ikat yang membentuk *chorioallantoic mesoderm* dan 3) epitel khorion yang merupakan lapisan paling luar dan fetal yang berasal dari trofoblas. Selain itu juga ada 3 jenis lapisan maternal yang menyusun plasenta, masing-masing yaitu 1) endotel yang berada sepanjang pembuluh darah endometrium, 2) jaringan ikat endometrium dan dan 3) sel-sel epitel endometrium sendiri (Gambar 2.2.2)

Tabel 2.2.2 Klasifikasi dan berbagai jenis plasenta berdasarkan jumlah lapisan jaringan maternal dan fetal yang masih tersisa

Jenis plasenta	Jaringan maternal			Jaringan fetal			Contoh
	Endotel	Jaringan ikat	Epitel uterus	Khionon	Jaringan ikat	Endotel	
Epitheliochorial	+	+	+	+	+	+	Kuda, babi
Syndesmochorial	+	+	-	+	+	+	Biri-biri sapi
Endotheliochorial	+	-	-	+	+	+	Kucing, anjing
Haemochorial	-	-	-	+	+	+	Manusia, primata, rodent

(Loke and King, 1995)

Namun demikian beberapa ahli melakukan penggolongan yang berbeda terhadap plasenta. Sebagai contoh, pada plasenta jenis *epitheliochorial*, yaitu yang dimiliki oleh kuda dan babi, didapatkan komponen jaringan maternal yang masih lengkap, termasuk epitel uterus. Plasenta milik hewan memamah biak adalah jenis *syndesmochorial*, namun banyak ahli anatomi berpendapat bahwa lapisan epitel dan uterus pada plasenta tetap ada, sehingga sebenarnya jenis plasentasi pada hewan golongan ruminansia ini adalah *epitheliochorial*.

Wooding (1992) membuktikan dan studi pada biri-biri, bahwa terdapat fusi dan sel-sel khionon fetal dengan sel-sel epitel uterus, sehingga jenis plasenta biri-biri dapat digolongkan menjadi *epitheliochorial* maupun *syndesmochorial*. Wooding mengusulkan nama *synepitheliochorial* sebagai istilah yang terbaik untuk plasenta ruminansia. Plasenta kucing dan anjing adalah jenis *endotheliochorial* di mana komponen maternal yang ada hanya lapisan endotel

Pada manusia dan binatang mengerat, epitel khoron fetal terendam di dalam darah ibu karena sel-sel fetal mengadakan invasi ke dalam lapisan jaringan endotel maternal. Jenis plasenta ini disebut *haemochorial*. (Renfree, 1982; Loke and King, 1996. Bowen, 2001)

Tabel 2.2.3 Jenis-jenis plasenta dan berbagai jenis mamalia

Order	Species	Placental form	Maternal-fetal Interdigitation	Maternal-fetal separating membrane
Insectivora	Europ. Mole	Discoid	Labyrinth	Hemochorial
	Scalopus	Diffuse	Labyrinth	Hemochorial
Chiroptera (Bats)		Discoid	Labyrinth	Endotheliochorial Occas. Hemochorial
Primates	Tupaia	Bidiscoid	Labyrinth	Endotheliochorial
	Galago	Diffuse	Folded	Epitheliochorial
	Rhesus	Bidiscoid	Villi	Hemochorial
	Ape, human	Discoid	Villi	Hemochorial
Lagomorpha	Rabbit, hare	Discoid	Labyrinth	Hemochorial
Rodentia	Guinea pig	Discoid	Labyrinth	Hemomonochorial
	Rat, mouse	Discoid	Labyrinth	Hemotrichorial
	Beaver	Discoid	Labyrinth	Hemodichorial
Carnivora	Dog, cat	Zonary	Labyrinth	Endotheliochorial
Sirenia	Manatee	Zonary	Labyrinth	Hemochorial
Artiodactyla	Pig	Diffuse	Folded	Epitheliochorial
	Sheep	Cotyledonary	Villi	Epithelio- & Syndesmochorial
	Cow, goat	Cotyledonary	Villi	Epitheliochorial
Perissodactyla	Horse	Diffuse, spec.	Villi, "cups"	Epitheliochorial
Cetacea	Whale, dolphin	Diffuse	Villi	Epitheliochorial

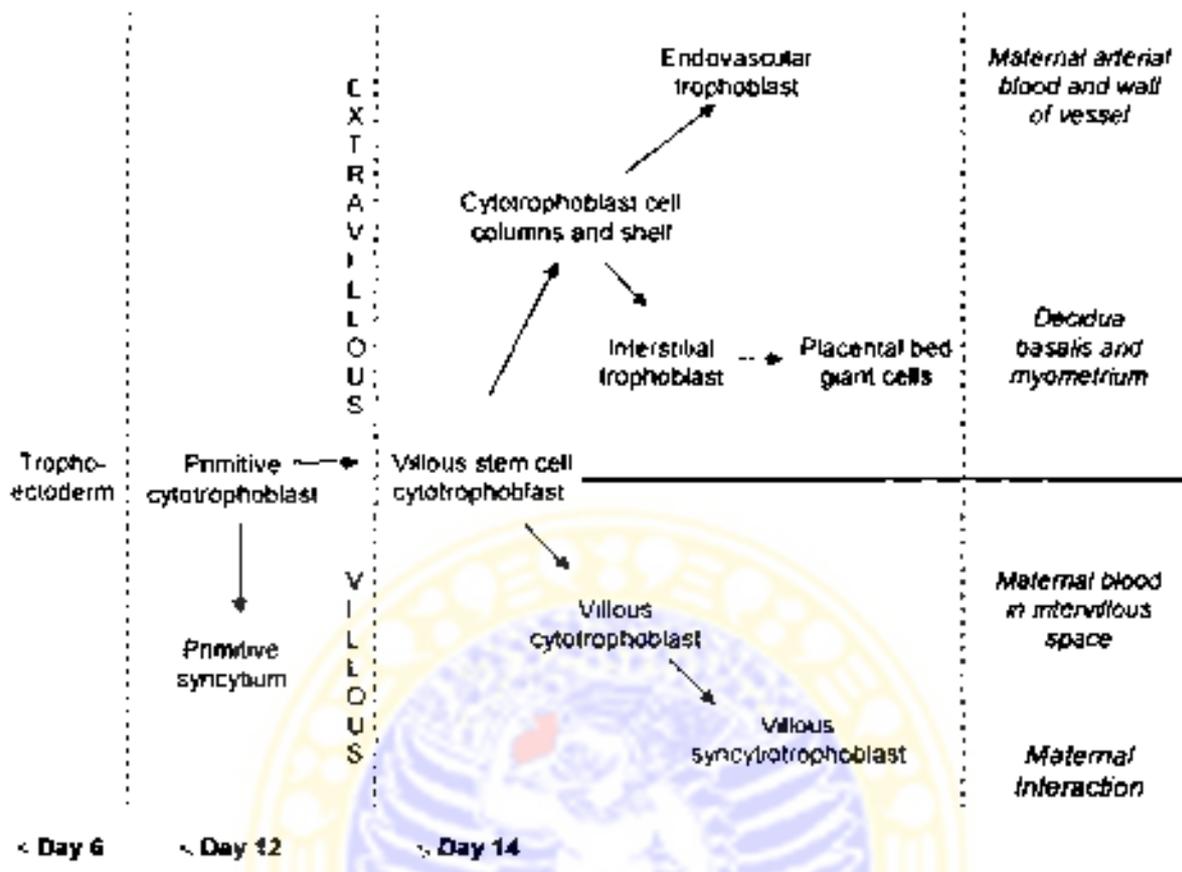
(Berrischke, 2002)

Berdasarkan sistem pembagian di atas (Tabel 2.2.3.), maka manusia dan binatang mengerat termasuk tikus dan mencit, sama-sama mempunyai jenis plasenta *discoid-haemochorial*. Namun bila diteliti lebih lanjut ternyata masih ada perbedaan susunan plasenta pada mencit dan manusia, yaitu pada struktur komponen trofoblas yang menghubungkan antara peredaran darah ibu dan anak. Pada manusia, komponen ini berbentuk vil, sedangkan pada rodentia berbentuk labyrinth (Renfree, 1982; Loke and King, 1996; Bowen, 2000; Berrischke, 2002).

2.2.1.1. Trofoblas

Plasenta terdiri dari jaringan trofoblas, yaitu jaringan yang disusun oleh sel-sel yang berasal dari pertumbuhan embrio; dan jaringan desidua yang berasal dari pertumbuhan lapisan endometrium ibu. Pertumbuhan sel-sel trofoblas maupun desidua, sama-sama dipengaruhi oleh mediator-mediator kimia, termasuk berbagai hormon pertumbuhan (*growth factors*) dan sitokin yang diproduksi secara lokal maupun sistemik (Cross *et al.*, 1994; Cunningham *et al.*, 1997; Coulam, 2000).

Dari seluruh komponen jaringan plasenta, trofoblast merupakan bagian yang sangat penting dan bervariasi dalam hal struktur, fungsi serta perkembangannya. Pada manusia, segera setelah terjadi nidasi, trofoblast berkembang melalui dua jalur utama, yaitu jalur *villous* dan *extravillous*, yang pada akhirnya berkembang menjadi dua kelompok sel yang secara histologis dapat dibedakan dengan jelas, yaitu sitotrofoblas dan sinsitiotrofoblas (Gambar 2.2.3). Pengetahuan tentang perbedaan ke dua jalur yang terpisah ini sangat penting, terutama pada manusia. Hal ini karena fungsi dari ke dua kelompok trofoblas dan jenis sel-sel ibu yang berhubungan dengannya, masing-masing berbeda. *Villous trophoblast* pada akhirnya meliputi seluruh vili khorionik dan plasenta, dan bertanggung jawab terhadap transport oksigen dan nutrisi dari ibu ke anak. Vili-vili tersebut terendam dalam darah dan berhubungan dengan sel-sel yang ada dalam sirkulasi. Sebaliknya, trofoblas ekstra vili bermigrasi ke dalam sampai ke mukosa uterus, bahkan sampai ke miometrium dan bertemu dengan berbagai jenis sel ibu, karena sel ini mengadakan infiltrasi ke jaringan uterus (Gambar 2.2.4.) (Loke and King, 1995)



Gambar 2.2.3. Diferensiasi trofoblast di tempat implantasi
(Loke and King, 1995)

Selanjutnya, jenis dan susunan populasi sel trofoblas pada manusia, yang berperan dalam fisiologi, homeostatis dan patologi imun terhadap ibu dapat diuraikan sebagai berikut:

a. *Villous trophoblast*

Gejala paling dini dan perkembangan vili adalah timbulnya tonjolan dan sitotrofoblas ke dalam sinsitium primitif pada awal kehamilan. Vili-vili primer berubah menjadi vili sekunder melalui penetrasi sel-sel mesenkim ke ujung sitotrofoblas yang padat dan menjadi vili tersier bila jaringan mesenkim tersebut disuplai oleh pembuluh darah embriolik (Loke and King, 1995).

- b. **Sinsitiotrofoblas**, yaitu sel-sel yang tumbuh dari sitotrofoblas melalui agregasi sel, kemudian menyatu membentuk sinsitium atau membran yang langsung terpapar dengan darah ibu dan seluruh efektor kekebalan yang ada di dalamnya. Membran ini menyelimuti seluruh hasil konseptus dan berfungsi sebagai penyaring biologis dalam dua arah pertukaran seluruh molekul, yaitu yang menuju atau meninggalkan peredaran darah bayi. Sinsitiotrofoblas mempunyai permukaan sangat luas, yakni hampir mencapai 25 meter persegi. Jaringan ini selain mempunyai kemampuan untuk selalu memperbarui diri sendiri, juga mempunyai status imunologis yang istimewa (*immunological privilege state*) untuk melindungi bayi yang sedang tumbuh dari pengaruh atau mekanisme efektor sitotoksik dan imun-autoimun (Beer and Kwak-Kim, 1998).
- c. **Cytotrophoblast anchoring cells**, yaitu sel-sel sitotrofoblas yang tersusun membentuk kolom dan terletak di bagian ujung vili matur bayi. Sel-sel ini melekatkan plasenta pada desidua maternalis dan langsung menyatu dengan jaringan tersebut (Beer and Kwak-Kim, 1998).
- d. **Trofoblas endovaskuler**, yaitu sitotrofoblas yang tumbuh dari *cytotrophoblast anchoring cells* (Loke and King, 1995), yang mengikis dan mengubah struktur pembuluh arteriol ibu yang memberi makan plasenta. Sel ini selain mengekspresikan HLA-G, juga menyebabkan pembuluh darah tersebut melebar dan kontraktilitasnya menurun. Limfosit besar yang bergranula (*large granular lymphocyte = LGLs*) di daerah ini mensintesa *nitric oxide* (NO) yang menginduksi relaksasi otot polos pembuluh darah (Beer and Kwak-Kim, 1998; Lyall, 1999).

- e. Sitotrofoblas ekstravili, yaitu sel-sel yang bermigrasi dan berinvasi ke, serta menetap di jaringan uterus. Sitotrofoblas ini mengekspresikan antigen MHC kelas I yang disebut HLA-G, yang memainkan peran sebagai immunoregulator, karena mereka sangat tidak peka terhadap lisis yang diperantarai sel NK (Beer and Kwak-Kim, 1998; Carosella, 1996; Hilla, 1999; Carosella, 1999).
- f. Trofoblas khorionik, dijumpai menyebar sangat banyak di jaringan yang membentuk *amniochorion*. Sel-sel ini menjamin pelekatan membran yang berisi cairan amnion ke lapisan uterus (Beer and Kwak-Kim, 1998).

Lebih lanjut dikatakan bahwa semua faktor yang dapat mengganggu diferensiasi sitotrofoblas menjadi sinsitotrofoblas dapat menghambat pertumbuhan plasenta dan desidua (Coulam, 2000)

2.2.1.2. Desidua

Desidua adalah jaringan unik seperti halnya trofoblas, tersusun oleh sel-sel yang berasal dari lapisan endometrium ibu yang berubah secara biologis, nutritif, struktur dan fungsi imunologis menjadi sel-sel desidua. Pada manusia, proses perubahan stroma endometrium ke jaringan desidua terjadi seiring dengan siklus menstruasi. Perubahan ini dipengaruhi oleh berbagai hormon seperti estrogen, progesteron dan berbagai stimulus lainnya. Setelah menstruasi, di bawah pengaruh hormon estrogen, terjadi proliferasi yang cepat pada sel-sel epitel maupun stroma endometrium. Segera setelah terjadinya ovulasi, kadar hormon progesteron meningkat, proliferasi kelenjar akan berhenti dan terjadi diferensiasi ke arah fase sekresi atau fase luteal. Dalam keadaan normal jaringan desidua ini pada akhirnya akan gugur dengan manifestasi perdarahan di akhir siklus menstruasi. Pada manusia proses desidualisasi ini terjadi secara spontan

walaupun tidak ada kehamilan. Hal ini berbeda dengan pada beberapa spesies lain, seperti tikus, mencit, marmot dan kelinci, di mana reaksi desidua baru mulai terjadi pada saat implantasi (Loke and King, 1995).

Struktur dan fungsi desidua khususnya dalam hubungannya dengan fungsi dan pertumbuhan plasenta, menjadi topik yang sangat menarik untuk dikaji. Bila kehamilan terjadi, perubahan stroma dan pertumbuhan ke arah desidua semakin luas dan kemudian menebal menjadi tiga lapisan. Lapisan paling atas, disebut desidua kompakta, berisi stroma desidua dengan kelenjar-kelenjar non sekresi yang tipis. Lapisan di bawahnya, adalah desidua spongiosa yang terdiri dari kelenjar-kelenjar sekresi yang melebar, yang terpisah dengan stroma yang tidak mengalami reaksi desidua oleh suatu lapisan tipis. Lapisan yang paling bawah tetap tidak berubah, dan dari lapisan ini regenerasi terjadi setelah menstruasi atau melahirkan. Setelah terjadi implantasi, pertumbuhan tiga daerah anatomi desidua di dalam uterus tersebut semakin jelas. Desidua basalis yang terletak di bagian bawah plasenta yang sedang tumbuh, dimasuki oleh sel-sel trofoblas ekstravilous. Desidua kapsularis yang membungkus embrio menyatu dengan desidua parietalis yang membatasi uterus diluar tempat implantasi. Penyatuan antara ke dua desidua tersebut menyebabkan degenerasi dari epitel permukaan uterus. Amniokhorion yang terbentuk dari regresi dari vili kapsular masuk ke dalam dan berhubungan dengan desidua parietalis dan ibu, dan ini merupakan bagian tambahan hubungan antara janin ibu dan bayi (Loke and King, 1995).

Seperti stroma epitel timus atau sumsum tulang, desidua merupakan tempat terjadinya pertukaran, pertumbuhan dan penggunaan limfosit dan sel-sel NK, serta berbagai jenis sitokin yang bersifat merangsang maupun menghambat pertumbuhan sel-sel trofoblas dan desidua sendiri. Di situ juga banyak sel-sel

limfosit pendatang yang diinduksi untuk mengalami apoptosis, serta bertanggung jawab terhadap fungsi-fungsi immunosupresif, merangsang pertumbuhan, membersihkan debris, pembentukan antigen dan sel NK. Pada tempat terjadinya implantasi, pembuluh-pembuluh limfe menjadi jarang. Proses koordinasi yang terjadi secara spesifik di antara faktor-faktor tersebut dalam pengaturan pertumbuhan sel-sel trofoblas dan desidua belum sepenuhnya di-fahami, tetapi telah diyakini bahwa keduanya ikut menentukan pertumbuhan, perkembangan dan kehidupan plasenta (Cunningham et.al, 1997; Beer and Kwak-Kim, 1998).

Selama kehamilan normal, jaringan desidua berisi berbagai jenis sel leukosit, tetapi sel-sel yang berasal dari sistem kekebalan nonspesifik nampaknya lebih dominan, karena jumlah sel-sel limfosit tidak lebih dari 5% (Loke and King, 1995). Di tempat implantasi, sebagian besar leukosit adalah sel-sel NK. Bila kehamilan berlanjut, jumlah sel-sel NK berkurang dan pada akhir kehamilan sel-sel leukosit tidak ada lagi. Di tempat implantasi, makrofag mengisi 20-30% sel-sel desidua, dan tidak seperti sel-sel NK, jumlah sel-sel makrofag tersebut tetap tinggi selama kehamilan berlangsung. Kondisi lokal di tempat implantasi tidak hanya ditentukan oleh jenis dan komposisi sel-sel yang ada, tetapi juga faktor-faktor terlarut yang diproduksi di tempat itu (Loke and King, 1995; Mor and Abrahams, 2003).

2.2.2. Mekanisme penerimaan dan penolakan buah kehamilan

Teori yang dikemukakan oleh Medawar (1953), menerangkan bahwa ada tiga mekanisme utama yang dapat menerangkan secara imunologis bagaimana konseptus yang merupakan *semiallogenic fetal graft* dapat diterima oleh ibu selama kehamilan berlangsung. Teori tersebut meliputi: 1) sifat antigenik dari embrio yang belum sempurna (*antigenic immaturity of the embryo or fetus*);

2) struktur anatomis antara ibu dan embrio yang terpisah; dan 3) adanya penurunan respon kekebalan ibu (*diminished immunological responsiveness of the pregnant woman*). Pada manusia, endometrium dapat menerima implantasi melalui pertumbuhan sel-sel trofoblas ke dalam desidua. Jadi, keberhasilan fetus untuk mempertahankan diri dan mekanisme penolakan ibu tidak hanya dipengaruhi oleh faktor-faktor yang dikeluarkan oleh desidua yang menghambat mekanisme kekebalan seluler, tetapi juga dipengaruhi oleh berbagai hormon serta interaksi antara rangkaian sitokin yang diproduksi oleh sel-sel limfoid maupun trofoblas (Ragupathy, 1997, Coulam, 2000).

Hatasaka (1996) menyebutkan bahwa ada dua strategi dasar yang sangat penting dan menarik perhatian serta berhubungan dengan alasan mengapa fetal-plasental semialograft tidak ditolak selama kehamilan berlangsung. Dua hal tersebut, yang pertama adalah melibatkan peristiwa penghindaran kekebalan ibu, dan yang kedua adalah kontrol aktif terhadap pengaturan kekebalan ibu (*immunomodulation*) (Tabel 2.2.4).

Tabel 2.2.4.: Strategi penting untuk melindungi fetal-plasental semi-alograft (Hatasaka and Scott, 1996)

STRATEGI PENGHINDARAN	IMUNOMODULASI AKTIF
Trofoblas sebagai barrier fisik	Konsentrasi progesteron plasenta yang tinggi
Eksresi HLA trofoblas yang kurang	Immunoregulasi yang diatur sitokin lokal
	<i>Blocking antibodies</i>

Berdasarkan konsep tersebut serta hubungannya dengan sifat spesifik janingan yang menyusun plasenta, maka setiap kehamilan yang terjadi di luar uterus semestinya tidak akan pernah berjalan dengan sempurna dan akan ditolak

oleh tubuh ibu. Keberhasilan konsep dan kelangsungan kehidupannya di dalam uterus ibu merupakan fenomena yang berhubungan dengan trofoblas, dan bukan dengan desidua (Medawar, 1953; Cross *et al.*, 1994; Hatasaka, 1996; Cunningham *et al.*, 1997; Munn *et al.*, 1998).

2.2.2.1. Peran makrofag dan sitokin dalam penerimaan konseptus

Komunikasi antara sel-sel desidua dan trofoblas dikendalikan oleh berbagai jenis sitokin dan reseptor di permukaan sel. Hasil dari komunikasi antar sel tersebut, adalah terjadinya berbagai perubahan ekspresi dan jenis dan jumlah sitokin yang ada, termasuk *colony stimulating factors* (CSF), TNF- α , interferon (IFN), *transforming growth factor* (TGF)- β , dan berbagai jenis *interleukin* (IL). Sel-sel imun, khususnya makrofag, adalah penghasil utama sitokin dan faktor-faktor pertumbuhan dan berperan dalam pemeliharaan keseimbangan yang adekuat antara Th1 dan Th2 pada tempat pelekatan plasenta. Keseimbangan produksi dan interaksi antara berbagai sitokin yang bersifat pro-inflamasi (Th-1) dan anti-inflamasi (Th-2) ini dikatakan sebagai penentu keberhasilan suatu kehamilan (Mor and Abrahams, 2003). Sampai saat ini masih diyakini bahwa untuk kelangsungan kehamilan normal produksi sitokin-sitokin proinflamasi seperti IL2, TNF α dan IFN γ menurun, sedang produksi sitokin anti-inflamasi seperti IL4, IL6 atau IL10 meningkat (Wegmann, 1993; Guilbert, 1996; Cunningham *et al.*, 1997; Couïam, 2000; Stemmer, 2000). Jaringan plasenta dan desidua pada kehamilan normal telah terbukti mengekspresi kedua jenis sitokin baik sitokin proinflamasi maupun anti-inflamasi. Sitokin-sitokin yang berasal dari sel T pro-inflamasi (Th-1) seperti IFN- γ dan TNF- α diketahui bersifat embriotoksik dan berhubungan dengan *pre-term delivery* sedangkan IL-1 β dan TNF- α dikatakan sebagai sitokin

penyebab terjadinya apoptosis pada sel-sel trofoblas, produksi protease, merangsang terjadinya angiogenesis dan biosintesis dari prostaglandin dan hormon (Hill, 1995, Yui, 1995). Sebaliknya, sitokin yang tergolong Th-2, seperti IL-4, IL-5, IL-6, IL-9 dan IL-10, berhubungan dengan produksi antibodi oleh sel limfosit-B dan TGF β berperan dalam hal penghambatan mekanisme penolakan ibu terhadap embrio pada awal kehamilan (Ragupathy, 1997; Munn *et al.*, 1998; Coulam, 2000). Respon dan keseimbangan interaksi kedua golongan sitokin tersebut sangat diperlukan untuk keberhasilan kehamilan. Respon Th-1 yang memproduksi sitokin pro-inflamasi diperlukan untuk mengawali proses implantasi melalui invasi trofoblas dan menginduksi proses angiogenesis, tetapi segera setelah proses itu selesai, dominasi respon Th1 bergeser ke respon Th-2. Keseimbangan ini nampaknya dikendalikan oleh sel T CD8+. Pada wanita hamil, sel CD8+ memunculkan reseptor progesteron lebih awal. Limfosit dengan reseptor progesteron positif memproduksi protein mediator yakni *progesterone-induced blocking factors* (PIBF), yang bertanggung jawab terhadap efek imunologik dan anti-abortif dan hormon progesteron. PIBF juga menginduksi produksi sitokin Th-2, sehingga pengaruhnya menjadi lebih dominan. Aktivitas sel CD8+ terlihat nyata selama fase preimplantasi dan peri-implantasi, yaitu ketika sitokin Th-1 aktif bekerja. Setelah implantasi, sel-sel Th-2 dan CD56+ berubah menjadi aktif. (Wegmann, 1993; Ragupathy, 1997; Hilla, 1997; Beer & Kwak Kim, 1998; Munn *et al.*, 1998; Stemmer, 2000; Coulam, 2000)

2.2.2.2. Peran makrofag dan sitokin dalam penolakan konseptus

Pada kenyataannya tidak setiap kehamilan dapat berjalan lancar dan berakhir dengan lahirnya bayi yang aterm hidup dan sehat. Telah dikenal berbagai faktor

dan mekanisme yang menerangkan terjadinya kegagalan kehamilan. Pada kasus kasus abortus berulang (*recurrent abortion*) misalnya, selain faktor anatomik dan hormonal, ternyata faktor genetik dan imunologik memiliki data yang lebih banyak dan akurat dalam menyokong mekanisme terjadinya kegagalan kehamilan tersebut (Coulam, 2000). *Anti phospholipid antibody* (APA) terbukti menghambat diferensiasi sitotrofoblas menjadi sinsitiotrofoblas (Rote, 1996). APA dan ANA (*anti nuclear antibodies*) juga terbukti mempunyai dampak langsung terhadap pre-embryo. Namun demikian belum jelas apakah ANA bekerja melalui mekanisme yang sama dengan APA (Kaidor, 1996). Selanjutnya secara imunologik dapat diterangkan bahwa hal apa saja yang dapat mempengaruhi diferensiasi sitotrofoblas menjadi sinsitiotrofoblas, dapat menghambat pertumbuhan plasenta dan desidua. Hal ini dapat juga terjadi pada bentuk kegagalan kehamilan yang lain. Secara singkat peran faktor imunologis dalam kaitannya dengan mekanisme terjadinya kegagalan kehamilan dapat diterangkan sebagai berikut: Pada fase implantasi, sitokin Th-1 secara dominan mengendalikan proses invasi sel-sel trofoblas dan proses angiogenesis. Pada kehamilan yang normal, segera setelah hal itu selesai, terjadi pergeseran dominasi dari Th-1 ke Th-2/3. Bila proses pergeseran ini tidak terjadi dan dominasi Th-1 tidak terkendali, maka Th-1 menjadi pemicu terjadinya kegagalan kehamilan karena aktivitas protrombinase fg12 (*fibrinogen-related procogulant*) meningkat. Sebaliknya, Th-2/3 memelihara kehamilan karena ekspresi fg12 menurun, sebagai hasil dari penghambatan generasi sitokin Th-1, aktivasi sel-sel endotel dan respon terhadap PMN. Sel-sel T CD8+ itu berperan mengendalikan keseimbangan antara Th-1, Th-2/3, sehingga kehamilan tetap berjalan normal. Sitokin PIBF dan sel CD8+ yang mengekspresi reseptor progesteron, ternyata menurunkan ekspresi fg12 (Coulam, 2000).

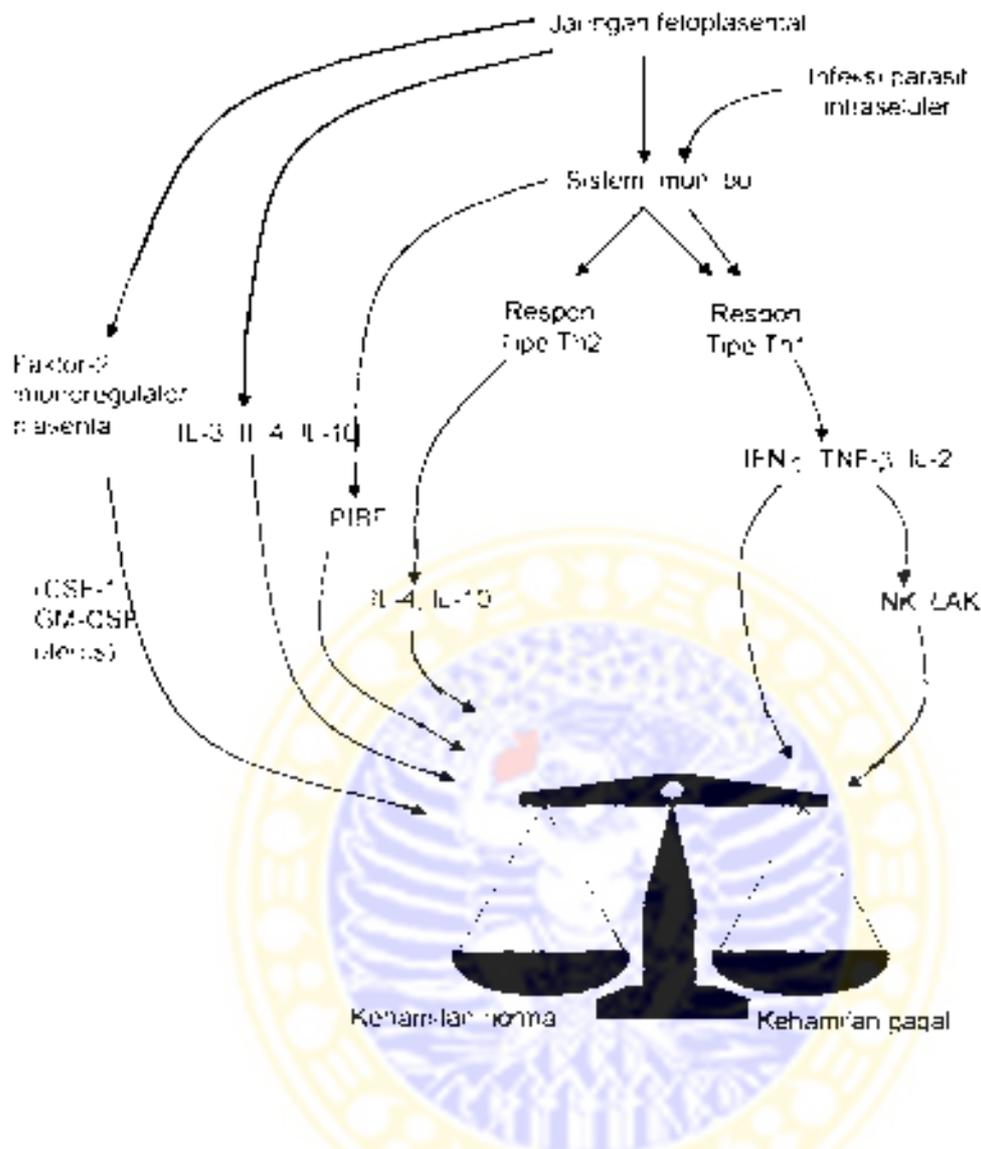
Keberadaan makrofag yang merupakan bagian terbesar baik dari komponen yang berasal dari ibu maupun anak di unit utero-plasenta, mempunyai peranan yang penting. Jenis sitokin yang diproduksi oleh makrofag sangat tergantung kepada aktivasi yang terjadi. Selama kehamilan normal terjadi keseimbangan antara multiplikasi, diferensiasi dan apoptosis sel-sel plasenta. Mor dan Abrahams (2003) mengemukakan bahwa pada kehamilan normal, pengaruh sel-sel yang apoptotik menekan makrofag yang teraktivasi untuk mensekresi sitokin-sitokin pro-inflamasi seperti $TNF\alpha$ dan $IFN\gamma$, dan merangsang pengeluaran sitokin Th2, yang bersifat antiinflamasi dan immunosupresif. Pada kehamilan dengan komplikasi pre-eklamsi atau *IUGR*, makrofag yang teraktivasi mensekresi sitokin-sitokin pro-inflamasi seperti $TNF\alpha$ dan $IFN\gamma$ yang menginduksi apoptosis sel-sel trofoblas ekstravilus (Mor and Abrahams, 2003).

2.2.3. Keseimbangan respon Th-1 : Th-2 pada infeksi selama kehamilan

Infeksi yang terjadi selama kehamilan, khususnya oleh parasit intraseluler, merupakan faktor penting yang dapat mempengaruhi respon kekebalan menuju ke arah tertentu. Pengamatan yang dilakukan oleh Krishnan (1996) untuk menilai respon Th-1 akibat infeksi *Leishmania major* pada mencit 257BL hamil yang resisten, menunjukkan bahwa jumlah fetus yang diresorpsi pada mencit resisten yang diinfeksi, lebih tinggi secara bermakna dibanding yang tidak diinfeksi. Produksi IL-4 dan IL-10 di plasenta juga menurun, sedangkan produksi $IFN\gamma$ dan TNF meningkat. Sitokin yang diproduksi di mana saja, dapat mengalir ke plasenta dan mempengaruhi rangkaian sitokin lokal (Khrisnann, 1996). Sitokin-sitokin Th-1 yang diinduksi oleh infeksi dapat melintasi *fetal interface*,

mempengaruhi trofoblas dan kehamilan, sehingga terjadinya respon Th-1 secara sistemik dapat menimbulkan gangguan terhadap kehamilan.

Sitokin Th-2 seperti IL-4 dan IL-10 diproduksi oleh jaringan fetoplasenta tikus seperti halnya oleh sel-sel PMN pada manusia, sebagai respon terhadap antigen trofoblas in vitro. Keuntungan dari pengaruh berbagai sitokin pada kehamilan dilengkapi oleh adanya dampak yang berlawanan dari sel-sel Th-1. Sitokin IL-3, GM-CSF dan CSF-1, bukan tipe sitokin Th-2, tetapi mempunyai pengaruh positif terhadap konsepsi. Faktor-faktor plasenta dan progesterone-induced blocking factors (PIBF) ikut berpengaruh positif dengan cenderung ke arah Th-2. Sebaliknya, reaktivitas tipe Th-1 dapat ditimbulkan oleh beberapa antigen fetoplasenta yang belum dikenal, seperti halnya yang disebabkan oleh infeksi parasit intraseluler. Respon ini dikendalikan oleh IFN- γ , TNF- β , IL-2, sel NK dan LAK. Dalam hal seperti ini sistem kekebalan ibu dihadapkan dengan pilihan yang sulit. Bila ibu harus melawan infeksi intraseluler melalui respon Th-1, hal ini akan membahayakan bayinya. Tetapi bila ia harus memelihara bayinya dengan mempertahankan pengaruh Th-2, berarti ia mengalah terhadap infeksi parasit. Untunglah, bahwa untuk suatu kehamilan, respon Th-2 tidak sedemikian mudah beralih ke respon Th-1, tetapi justru respon Th-1 yang beralih ke Th-2 (Ragupathy, 1997). Dengan demikian dapat dipikirkan kenapa pada berbagai kasus, walaupun terjadi infeksi, kehamilan tetap berlangsung, tetapi pada kasus yang lain mengalami kegagalan. Kegagalan kehamilan dapat terjadi karena berbagai sebab yang menimbulkan gangguan keseimbangan respon Th-1 dan Th-2 dalam berbagai tingkat dan derajat. (Gambar 2.2 4).



Gambar 2.2.4 Hubungan antara pola reaktivitas Th-2 dan Th-1 pada kehamilan

Sitokin-sitokin Th-2 (IL-4 dan IL-10) diproduksi oleh sel-sel mononuklear unit fetoplasenta mendi maupun manusia sebagai respon terhadap antigen *in vitro*. Pengaruh yang menguntungkan dan sitokin-sitokin ini terhadap kehamilan adalah efek yang antagonistik terhadap Th-1. IL-3, GM-CSF dan CSF-1 bukan termasuk sitokin Th-2, tetapi mempunyai pengaruh positif terhadap kehamilan, demikian juga faktor-faktor plasenta dan *progesterone-induced blocking factors* (PIBF). Sebaliknya, reaktivitas Th-1 dipicu oleh antigen-antigen fetoplasenta yang belum dapat diidentifikasi, sebagai respon yang tidak jelas seperti pada infeksi parasit intraseluler. Respon ini diperantarai oleh *interferon-γ* (IFN-γ), *tumor necrosis factor-β* (TNF-β) IL-2, sel-sel *natural killer* (NK) dan sel sel *lymphokine-activated killer* (LAK). (Ragupathy, 1997)

2.2.4. Bentuk kegagalan kehamilan yang terjadi akibat infeksi

Dari uraian tersebut di atas dapat dipikirkan bahwa setelah penyebaran hematogen akibat infeksi dapat terjadi kegagalan kehamilan dengan berbagai manifestasi klinis. Manifestasi tersebut dapat berupa kematian dan resorpsi janin, abortus dan kelahiran mati, kelahiran bayi hidup prematur maupun matur dengan kondisi cacat atau bisa juga normal. Akibat dari infeksi janin bisa terlihat pada saat lahir, seperti bayi lahir dengan berat badan rendah (*LBW = low birth weight*) sebagai akibat dari *IUGR (Intra Uterine Growth Retardation)*, lahir dengan cacat bawaan, penyakit kongenital, mungkin juga lahir normal atau tidak ditemukan kelainan apapun. Infeksi *in utero* mungkin dapat menetap dan manifestasinya sudah terlihat segera setelah lahir, atau baru menunjukkan kelainan yang nyata selama pertumbuhan, atau mungkin tidak diketahui sampai beberapa bulan atau tahun setelah lahir (Klein and Remington, 1995).

2.2.4.1. Kematian dan resorpsi janin

Berbagai jenis mikroorganisme patogen dapat menginfeksi ibu hamil pada minggu-minggu pertama dari kehamilan dan menyebabkan kematian dan resorpsi janin. Karena hal ini seringkali terjadi pada tahap awal dari kehamilan atau sebelum wanita tersebut menyadari bahwa dirinya hamil sehingga ia datang mengunjungi dokter, maka angka kejadian kegagalan kehamilan dini (*Early Pregnancy Loss = EPL*) ini sulit diperkirakan. Angka kejadian kegagalan kehamilan setelah implantasi karena berbagai sebab diperkirakan mencapai 25 - 40%, sedangkan proporsi kegagalan yang disebabkan oleh infeksi tidak diketahui dengan pasti (Klein and Remington, 1995; Nowitz *et al.*, 2001).

2.2.4.2. Abortus dan lahir mati (*stillbirth*)

Kelainan yang terjadi akibat dan infeksi pada bayi yang dapat dideteksi paling dini adalah setelah minggu ke enam sampai dengan minggu ke delapan dari kehamilan, termasuk di antaranya adalah abortus dan lahir mati. Kematian bayi intra-uteri mungkin merupakan akibat dari infeksi fetal yang berat, di mana mikroorganisme mempengaruhi proses organogenesis, sehingga pertumbuhan ke arah berbagai fungsi penting yang menjamin kehidupan terhambat (Klein and Remington, 1995).

Pada manusia, abortus spontan (*Spontaneous abortion = SAB*) didefinisikan sebagai berakhirnya suatu proses kehamilan sebelum usia 20 minggu, ditandai dengan keluarnya hasil kehamilan berupa embrio atau janin secara spontan, dengan berat kurang dari 500 gram (Hatasaka, 1994; Brent and Beckman, 1994; Bernas, 1997). Definisi lama menyebutkan bahwa batas umur kehamilan yang termasuk dalam kategori abortus adalah 28 minggu, tetapi kemudian berat badan 500 gram lebih dipilih sebagai patokan, karena berat tersebut merupakan batas minimum dari janin untuk dapat bertahan hidup dan umumnya dimiliki oleh janin usia 20–22 minggu (Hatasaka, 1994). Mekanisme yang pasti dari terhentinya proses kehamilan dini ini masih belum diketahui. Pada berbagai kasus sulit ditentukan apakah kematian janin tersebut merupakan penyebab atau justru akibat dari proses penolakan oleh ibu (Klein and Remington, 1995).

Faktor penyebab abortus adalah sangat kompleks, tetapi di antara para wanita yang mengalami abortus berulang, penyebab yang dapat diidentifikasi ternyata tidak lebih dari 50%. Menurut Tho *et al.*, (1979), penyebab abortus selain faktor endokrin (23%) dan faktor kromosom (12%), sisanya adalah faktor genetik

yang multifaktorial (13%) dan faktor lain yang tidak diketahui (37%) Coulam (1986) menyebutkan bahwa sebagian besar abortus disebabkan oleh faktor imunologis (40%) dan defisiensi hormon (29%), sedangkan sisanya adalah faktor kelainan anatomik (10%), faktor genetik (6%) dan faktor lain yang tidak diketahui (15%) Dan penelitian Hatasaka (1994) diperoleh angka-angka penyebab abortus, sebagian besar adalah idiopatik (79%), sedangkan sisanya yang 21% terdiri dari faktor-faktor kelainan pada fase luteal (*luteal phase defect / LPD* = 8%), genetik (6%), sindroma antifosfolipid (1%) kelainan uterus (2%), serta gabungan antara LPD dan kelainan uterus (4%) Jadi, faktor-faktor penyebab abortus yang dapat dikemukakan di sini adalah genetik, kelainan anatomis, infeksi gangguan endokrin, imunologik, dan faktor-faktor lain yang tidak dapat diidentifikasi (Tho, 1979; Coulam, 1986; Hatasaka, 1994; Dudley, 1995; Chung and Yeko, 1996)

Infeksi merupakan salah satu faktor penyebab terjadinya abortus yang cukup penting dan perlu diperhatikan (Brent and Beckman, 1994). Infeksi lokal dengan berbagai organisme seperti *Mycoplasma*, *Ureoplasma* *Listena* dan *Toxoplasma* dikatakan dapat berperan terhadap terjadinya abortus berulang, tetapi belum dapat dibuktikan secara pasti bahwa salah satu dari organisme tersebut benar-benar merupakan penyebab atas terjadinya abortus. Infeksi sistemik yang dialami oleh wanita selama kehamilan, walau tidak langsung mengenai organ-organ reproduksi juga dapat berpengaruh terhadap kehamilan (Chung and Yeko, 1996). Namun demikian pustaka terbaru menyebutkan bahwa abortus yang disebabkan oleh faktor infeksi karena berbagai mikroorganisme hanya berkisar 5% di antara penyebab yang lain (Pietrantonio, 2002) Tabel 2 2 6 di bawah ini menunjukkan berbagai faktor yang dapat diidentifikasi sebagai faktor-faktor penyebab abortus

Tabel 2 2 5 Berbagai faktor yang disebut sebagai penyebab abortus

Pemulis (tahun)	Faktor penyebab tersering (%)
Cho (1976)	<i>Endocrine (23%), Mullerian (15%), Multifactorial genetic (13%), Chromosomal (12%), Unknown (37%)</i>
Coulam (1986)	<i>Immunologic disorder (40%), Hormonal deficiency (29%), Anatomic defects (10%), Genetic (6%), Unexplained (15%).</i>
Hatasaka (1994)	<i>Luteal Phase Defect / LPD (8%), Genetic (6%), Uterine Malformation and LPD (4%), Uterine Malformation (2%), Idiopathic (79%)</i>
Pietrantonio (2002)	<i>Anatomic (15%), Immunologic (15%), Endocrine (5%-8%), Genetic (3%-5%), Microbiologic (< 5%)</i>

2.2.4.3. Kelahiran prematur/prematuritas

Semula semua bayi yang lahir dengan berat kurang dan 2500 gram dikelompokkan sebagai kelahiran prematur, tetapi sekarang diketahui bahwa hampir sepertiga bayi lahir mendekati term tetapi berat badannya rendah. Selanjutnya istilah kelahiran prematur digunakan untuk semua kelahiran bayi sebelum mencapai usia kehamilan 37 minggu, tanpa memperhatikan berat badan (Creasy and Resnik, 1999). Kelahiran prematur mungkin disebabkan oleh agen apapun yang menginfeksi janin selama trimester akhir dan kehamilan. Jadi mikro-organisme yang secara umum dapat menyebabkan abortus atau lahir mati, juga termasuk penyebab yang penting atas terjadinya prematuritas (Klein and Remington, 1995). Angka kejadian kelahiran prematur tidak dapat dicatat dengan baik karena sulit dibedakan antara prematuritas dengan terhentinya pertumbuhan janin di dalam uterus (*intra uterine growth restriction* = IUGR). Diperkirakan angka kejadian prematuritas sekitar 10-11%, dan mungkin bervariasi di antara populasi yang berbeda, tergantung dari faktor risiko yang ada (Creasy and Resnik, 1999). Faktor risiko yang berhubungan dengan terjadinya prematuritas cukup banyak

Faktor-faktor tersebut diantaranya adalah kehamilan ganda, umur ibu kurang dari 18 tahun, adanya riwayat abortus atau kelahiran prematur sebelum kehamilan sekarang, perdarahan sebelum kehamilan umur 28 minggu, merokok lebih dari sepuluh batang per hari, dan infeksi pada kehamilan. Berbagai mikroorganisme termasuk *Chlamydia*, *Trichomonas*, jamur, *Streptococcus grup B*, *Mycoplasma* dan *Ureoplasma* telah diidentifikasi ada di vagina, serviks, desidua dan cairan amnion pada wanita yang melahirkan bayi prematur (Creasy and Resnik, 1999)

2.2.4.4. IUGR dan low birth weight (LBW)

Infeksi pada janin dapat menyebabkan bayi lahir dengan berat badan yang tidak sesuai dengan umur kehamilannya. Kelahiran bayi dengan berat badan rendah (*small-for-date infants*) sering dihubungkan dengan berbagai jenis infeksi pada ibu, tetapi sejauh ini yang sudah terbukti adanya hubungan sebab-akibat baru infeksi virus *Rubella* dan *CMV*. Belum ditemukan adanya pengaruh infeksi bakteri terhadap IUGR. Infeksi protozoa seperti *Toxoplasma gondii*, *Plasmodium* dan *Trypanosoma cruzi* juga dapat menyebabkan IUGR (Klein and Remington, 1995; Creasy and Resnik, 1999)

Pada penelitian lebih lanjut dilaporkan bahwa ternyata sel-sel pada organ-organ tubuh dan bayi yang meninggal karena sindroma rubella kongenita dan infeksi *CMV*, yang secara morfologis bentuknya normal, jumlahnya menurun. Sebagai pembandingan pada bayi-bayi yang lahir dengan berat badan rendah karena penyebab non-infeksi seperti keracunan kehamilan atau gangguan plasenta, jumlah sel-sel pada organ tubuhnya normal tetapi jumlah sitoplasmanya menurun. Keadaan ini patut diduga terjadi karena malnutrisi pada janin (Klein and Remington, 1995)

2.2.4.5. Gangguan pertumbuhan dan cacat lahir

Telah diketahui bahwa infeksi *Rubella* dan *CMV* dapat menyebabkan gangguan pertumbuhan janin *Coxsackievirus B3* dan *B4* dihubungkan dengan penyakit jantung bawaan. Mekanisme patogenesis terjadinya cacat lahir akibat berbagai jenis penyebab infeksi masih belum jelas. Kajian histologik dari jaringan abortus dan bayi-bayi yang terinfeksi dalam kandungan menunjukkan bahwa cara kerja dari beberapa virus adalah gangguan terhadap kemampuan apoptosis, pertumbuhan sel atau menyebabkan kerusakan khromosom. Kerusakan akibat proses inflamasi yang disebabkan oleh mikro organisme harus dibedakan dengan gangguan yang timbul akibat pengaruh langsung dari mikro organisme tersebut terhadap pertumbuhan sel dan jaringan embrio yang sedang tumbuh. Proses inflamasi dan destruksi jaringan nampaknya lebih bertanggungjawab terhadap terjadinya kerusakan struktur jaringan dan organ, seperti pada *congenital syphilis* dan toksoplasmosis (Klein and Remington, 1995). Bayi-bayi dengan toksoplasmosis kongenita mungkin menderita *microcephaly*, *hydrocephalus* atau *microphthalmia* (Remington et al., 1995). Penelitian Sardjono pada selama tahun 1996 sampai dengan 1998 menunjukkan bahwa angka kejadian toksoplasmosis pada kejadian bayi cacat bawaan yang lahir di Malang cukup tinggi yaitu lebih dari 50%. Adapun jenis cacat bawaan yang paling banyak ditemukan pada penelitian tersebut adalah *hydrocephalus* (27,78%) dan *microcephaly* (12,96%). Namun demikian pada pemeriksaan PCR dari 99 sampel jaringan plasenta yang berasal dari 54 bayi lahir cacat dan 45 bayi lahir normal pada penelitian tersebut tidak ditemukan adanya DNA *Toxoplasma* (Sardjono, 1998, Sardjono, 2000). Hasil penelitian tersebut belum dapat menjawab dugaan bahwa toksoplasmosis adalah penyebab terjadinya cacat bawaan, dan demikian juga bagaimana mekanismenya.

2.2.4.6. Penyakit bawaan

Tabel 2.2 4. di bawah ini menunjukkan berbagai jenis manifestasi klinis dari infeksi *intra-uterine* yang dapat dideteksi pada pengamatan bayi segera atau beberapa saat setelah lahir, khususnya untuk mikroorganisme yang tergolong TORCH (*Toxoplasma, Rubella, Cytomegalovirus Herpes simplex*). Manifestasi klinis dapat dijumpai pada saat lahir, segera sesudahnya atau beberapa tahun kemudian.

Tabel 2 2.6 Manifestasi klinik dan janin yang terinfeksi TORCH selama kehamilan yang terlihat pada pengamatan saat lahir (Klein and Remington, 1995).

Gejala klinik	Jenis mikroorganisme			
	<i>Toxoplasma</i>	<i>Rubella</i>	<i>Cytomegalovirus</i>	<i>Herpes simplex</i>
Hepatosplenomegali	+	+	+	+
Jaundice	+	+	+	+
Adenopathy	+	+	-	-
Pneumonitis	+	+	+	+
Meningo-encephalitis	+	+	+	+
Microcephaly	+	-	++	+
Hydrocephalus	++	+	+	+
Intra cranial calcification	++	-	++	-
Hearing defects		+	+	-
Congenital Heart defects	-	++	-	-
Myocarditis	+	+	-	+
Glaucoma	-	++	-	-
Chorioretinitis	++	++	+	+
Cataracts	+	++	-	+
Optic atrophy	+	-	+	-
Microphthalmia	+	+	-	-
Uveitis	+	-	-	-

Keterangan

- = tidak ditemukan atau jarang terjadi pada bayi
- + = ditemukan pada bayi yang terinfeksi
- ++ = mempunyai nilai diagnostik yang bermakna untuk infeksi tersebut

2.2.4.7. Lahir normal

Sebagian besar bayi yang ketika masih berada di dalam kandungan ibu terinfeksi virus *Rubella*, *CMV*, *HIV* atau *Toxoplasma gondii*, tidak menunjukkan gejala klinik pada saat lahir. Infeksi mikroorganisme dalam dosis kecil atau oleh galur yang virulensinya rendah atau non virulen dapat dihubungkan dengan rendahnya angka kejadian manifestasi klinis ini. Faktor lain yaitu usia kehamilan pada saat terjadinya infeksi, juga ikut berperan terhadap kejadian ini. Sebagai contoh bila infeksi *Rubella* dan *Toxoplasma gondii* terjadi pada trimester akhir dan kehamilan, angka kejadian penyakit yang terdeteksi pada saat lahir lebih rendah dibandingkan dengan bila infeksi terjadi pada trimester pertama atau ke dua (McCabe, 1990; Russo, 1994; Remington, 1995, Klein and Remington, 1995). Fenomena ini merupakan hal yang menarik untuk dikaji lebih jauh.

2.2.5. Toksoplasmosis dan kehamilan pada manusia dan hospes lain

Pada manusia, toksoplasmosis dikenal sebagai salah satu anggota jajaran penyakit yang tergolong TORCH, yang sering dikatakan sebagai penyebab gangguan kehamilan. Istilah TORCH semula merupakan singkatan dan empat jenis penyakit, yakni *Toksoplasmosis*, *Rubella*, *Cytomegalo-virus* dan *Herpes simplex*. Dalam perkembangan lebih lanjut kemudian huruf O diartikan sebagai *Other Diseases*, seperti *syphilis*, *infeksi streptococcus grup B*, *listeriosis* dan lain-lain *Chlamydia trachomatis*, salah satu mikroorganisme yang relatif baru, dimasukkan ke dalam huruf C; sedangkan huruf H dapat meliputi beberapa penyakit lain, yakni *Hepatitis B virus*, *Hepatitis C virus*, *Human Immuno-deficiency virus (HIV)*, *Human Papilloma virus (HPV)* dan *Human Parpovirus*. (Sofowean, 1991; Stray-Pedersen, 1997). Walaupun telah diketahui bahwa toksoplasmosis

merupakan salah satu penyakit yang dapat menyebabkan abortus dan gangguan kehamilan lain; namun seberapa besar kontribusinya, masih banyak pendapat yang saling bertentangan. Beberapa peneliti mengatakan bahwa kontribusi infeksi toksoplasmosis sebagai penyebab abortus hanya sekitar 1,38% (Stojanovic, 1998) sampai 7,1% (Crucerescu, 1998), namun peneliti lain menyebutkan bahwa peran toksoplasmosis terhadap kehamilan cukup tinggi, yaitu sekitar 50% bahkan sampai 55% (Altintas, 1997, Zargar, 1998). Di Iraq, pada pemeriksaan serologis dari 81 wanita yang mengalami abortus berulang, hanya 15 diantaranya (18,5%) yang positif. Walaupun demikian, angka ini berbeda bermakna bila dibandingkan dengan kelompok kontrol atau hamil normal, di mana yang menunjukkan hasil positif hanya 7 dari 119 kasus (5,9%) (Al-Hamdani, 1997).

Berbagai penelitian yang telah dilakukan menunjukkan adanya hubungan yang erat antara parasitemia pada ibu atau induk hewan dengan transmisi kepada anaknya. Studi pada mencit bunting yang diinfeksi dengan galur virulen *Toxoplasma gondii* menunjukkan bahwa transmisi kongenital tidak dijumpai bila infeksi terjadi kurang dari 5 hari. Transmisi parasit dari mencit yang terinfeksi kepada anaknya terbanyak dijumpai pada anak-anak mencit yang dilahirkan pada hari ke 7 setelah infeksi, yaitu sebanyak 56%. Seluruh plasenta dari anak mencit tersebut ditemukan mengandung *Toxoplasma*, tetapi tidak dapat dijelaskan apakah hal tersebut disebabkan oleh infeksi fokus, ataupun akibat parasitemia yang terjadi selama berlangsungnya infeksi akut. Pada tikus, bila infeksi dilakukan pada hari ke sepuluh dan kebuntingan, fetus dan plasenta sudah mengandung *Toxoplasma* pada hari ke empat belas. Semua induk tikus mengalami parasitemia, dan semua anak dan plasentanya terinfeksi (Remington, 1995)

Observasi terhadap infeksi kongenital juga dilakukan pada hewan-hewan domestik, termasuk kucing, anjing, babi, kambing dan biri-biri. Infeksi kongenital dijumpai sebagai epizootic pada biri-biri dan menyebabkan kegagalan kebuntingan berupa kematian embrio dini, mumifikasi dari janin, abortus dan lahir mati. Kematian embrio dan kelahiran mati mungkin disebabkan oleh lesi nekrotik lokal pada *cotyledon* plasenta. Pada domba, plasenta terinfeksi lebih dulu dan fetus baru terinfeksi beberapa hari kemudian. Pada penelitian eksperimental tentang transmisi kongenital pada biri-biri ditemukan fakta bahwa transmisi hanya terjadi bila induk biri-biri terinfeksi selama kebuntingan, bukan sebelumnya. Bila biri-biri yang seronegatif diinfeksi pada hari ke-30 dari kebuntingan, kematian dini atau mumifikasi dari fetus yang terinfeksi sering terjadi. Bila infeksi dilakukan pada hari ke-90 dari kebuntingan, sering terjadi transmisi kongenital, tetapi hanya sebagian kecil yang mengalami keguguran. Pada beberapa kasus, terjadi kelahiran hidup dan sekitar 20% diantaranya mati (Remington, 1995).

Pada penelitian lain Owen (1986b) telah melakukan percobaan terhadap 15 ekor biri-biri yang dikawinkan secara bersamaan, dan pada usia kebuntingan 80-90 hari masing-masing diinfeksi dengan parasit *Toxoplasma gondii* sebanyak 2000 ookista. Infeksi ini menimbulkan gejala demam dan hasil pemeriksaan serologis yang positif pada 15 biri-biri tersebut. Pada observasi lebih lanjut ternyata 11 dari 15 biri-biri yang diinfeksi tersebut mengalami abortus, dengan demikian angka kejadian abortus (*abortion rate*) akibat infeksi *Toxoplasma gondii* pada percobaan ini cukup tinggi, yaitu 73,3% (Owen, 1986b). Pada percobaan Owen ini ditemukan suatu hal yang menarik. Hasil pemeriksaan serologis terhadap biri-biri tersebut semuanya positif, demikian juga pada pemeriksaan sampel jaringan plasenta dari anak biri-biri yang lahir hidup dengan menggunakan

2.3. Pertumbuhan dan Kematian Sel

Sel adalah unit terkecil yang menyusun jaringan tubuh organisme. Jumlah sel yang menyusun jaringan tubuh organisme multiseluler diatur oleh suatu mekanisme yang disebut homeostasis, yaitu mekanisme yang mengendalikan keseimbangan antara kecepatan proliferasi dan eliminasi sel pada masing-masing jaringan. Sepanjang kehidupan normal, proliferasi dan eliminasi sel terjadi secara terus menerus. Proses ini terjadi sedemikian rupa, sehingga jaringan tubuh dari organisme itu sendiri dapat tumbuh dan berkembang serta melakukan fungsi-fungsi kehidupan yang lain dengan baik. Proliferasi sel yang lebih cepat, dijumpai pada fase pertumbuhan atau pada proses keganasan. Sebaliknya, proses eliminasi sel yang berlebihan dapat menyebabkan kerusakan jaringan atau bahkan dapat menyebabkan gangguan pertumbuhan organ (agenesis).

Berdasarkan prinsip dasar dalam biologi bahwa sel adalah unit struktural dan fungsional terkecil dari organisme, maka kerusakan struktur sel merupakan awal dan kerusakan atau kematian jaringan dan organisme. Walaupun demikian kematian sel di dalam jaringan tubuh manusia dan organisme multiseluler yang lain tidak selalu merupakan hal yang abnormal. Kematian sel terkadang justru merupakan proses yang dipertukan sebagai kebutuhan yang mendasar bagi organisme, agar dia dapat tetap bertahan hidup dalam kondisi seimbang. Dalam beberapa hal tertentu kematian sel bahkan merupakan mekanisme yang sengaja dilakukan oleh individu tersebut untuk melindungi diri. Mekanisme kematian sel yang dilakukan dengan sengaja juga digunakan oleh sel untuk melawan pengaruh dari luar yang merugikan, atau bahkan mungkin mengancam kehidupan individu yang bersangkutan (Stites, 1997; Hettis, 1998).

2.3.1. Nekrosis dan apoptosis

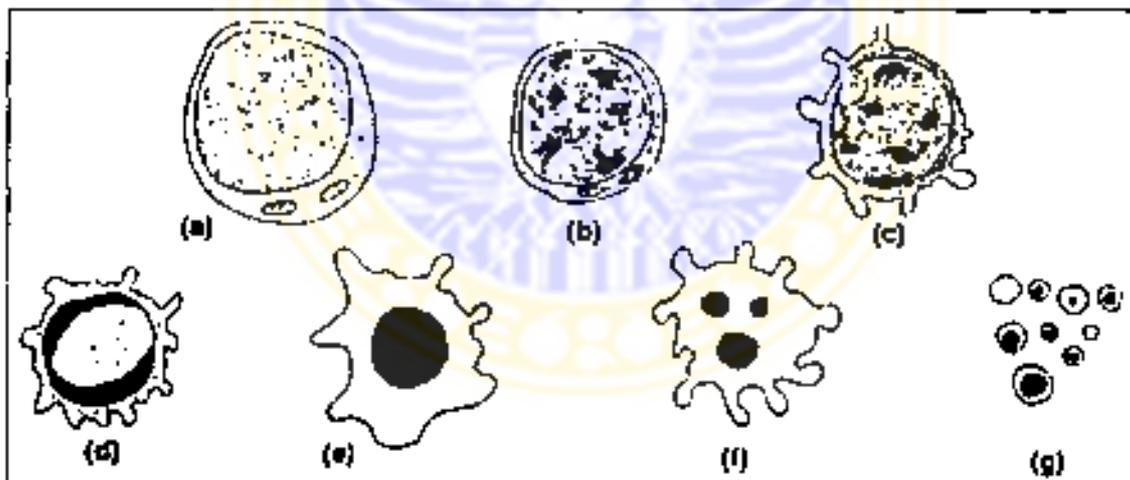
Kematian sel organisme multiseluler, secara umum dapat terjadi melalui dua cara yang berbeda. Tergantung dari ciri-ciri, hakekat dan penyebab kematian sel tersebut, dua jenis kematian sel itu dibedakan sebagai kematian yang patologis (nekrosis) dan kematian yang terprogram (apoptosis). Walaupun sejak awal sampai dengan akhir proses kematian sel yang terjadi akibat proses nekrosis dan apoptosis sangat berbeda, namun dalam praktek, pengamatan gambaran histologik untuk membedakan ke dua hal tersebut tidak selalu dapat dilakukan dengan mudah (Cotran, 1999). Hal ini selain sangat tergantung pada tahap atau fase kerusakan sel yang terjadi pada saat pengambilan sampel jaringan dan pembuatan sediaan juga tergantung pada fasilitas dan kemampuan individu yang memeriksanya.

Nekrosis adalah kematian sel yang terjadi akibat rangsangan mendadak, seperti *ischaemia*, *hipertermia* yang lama, maupun rudapaksa secara fisik atau kimia. Secara histopatologis dapat diamati bahwa sel-sel yang mengalami nekrosis membengkak dan pecah, mengeluarkan sitosol atau substansi yang terkandung dalam sitoplasma beserta intinya ke daerah sekitarnya (*intercellular milieu*), sehingga menimbulkan reaksi radang. Walaupun pada hakekatnya nekrosis adalah hal yang penting sebagai reaksi terhadap rudapaksa akut dan berbagai reaksi radang yang berat, tetapi hal ini bukan merupakan mekanisme yang seharusnya terjadi pada proses kematian sel. Sampai sekitar tahun 70-an, nekrosis dikenal sebagai satu-satunya bentuk kematian sel, sehingga setiap kematian sel terkesan sebagai gangguan atau hal yang tidak fisiologis atau abnormal (Cohen, 1993; Helts, 1998)

Apoptosis adalah bentuk kematian sel yang prosesnya terjadi lebih halus, dan disebut kematian sel yang terencana (*programmed cell death*). Pada tahun 1972, Kerr *et al* mempublikasi sebuah artikel tentang proses kematian sel yang disebut "apoptosis". Istilah ini berasal dari bahasa Yunani yang artinya "gugur" atau "rontok". Apoptosis adalah suatu proses yang terorganisir, *energy dependent*, yang bertujuan ke arah kematian sel (Saraste, 1999). Apoptosis terjadi sebagai salah satu mekanisme perlindungan terhadap diri sendiri misalnya pada proses homeostasis, pengaturan jumlah sel selama pertumbuhan dan pada beberapa penyakit seperti kanker. Proses ini terjadi melalui aktivasi program intrinsik dari sel untuk melakukan "bunuh diri", karena bila ia tetap hidup, justru menyebabkan kerusakan yang lebih berat (Steller, 1995; Majno, 1995; Vermees, 1999).

Batasan apoptosis didasarkan atas gambaran morfologik yang jelas dan adanya pemecahan DNA di dalam inti (Cohen, 1993; Saraste, 1999). Apoptosis paling baik dilihat pada sediaan dengan mikroskop elektron, tetapi dapat juga dilihat dengan mikroskop cahaya biasa. Pada sediaan yang dipulas dengan hematoxilin-eosin, sel apoptotik dapat terlihat sebagai masa bulat atau oval dengan sitoplasma yang sangat eosinofilik dan fragmen kromatin yang padat. Seringkali proses apoptosis di jaringan tidak dapat dideteksi dan sediaan dan pemeriksaan histologis biasa karena prosesnya yang berjalan dengan cepat dan segera dibersihkan oleh proses fagosit (Cotran, 1999). Sel yang mengalami bunuh diri secara apoptosis, mengalami penyusutan dan kehilangan hubungan normal antar sel. Secara bertahap ia akan menunjukkan kondensasi kromatin yang padat fragmentasi nukleus, penyusutan sitoplasma dan pemecahan sel menjadi "*apoptotic bodies*" (badan apoptotik) yang kecil-kecil. Badan apoptotik ini segera ditagosit dan dimakan oleh sel-sel tetangga atau makrofag. Dalam proses

ini tidak terjadi pengeluaran isi sel ke ruangan antar sel, sehingga tidak ada pemicu terjadinya peradangan. Dengan demikian maka pada proses apoptosis tidak ditemukan tanda-tanda seperti pada nekrosis. Penemuan tentang apoptosis ini merupakan prestasi gemilang dalam bidang histologi. Pada sebuah sediaan jaringan normal yang mengandung berjuta-juta sel, hanya beberapa saja di antaranya yang dapat menunjukkan perubahan struktur apoptosis yang spesifik pada suatu saat tertentu, karena urutan perubahan morfologi pada apoptosis dapat terjadi secara lengkap dalam waktu kurang dari satu jam (Cohen, 1993; Majno, 1995; Hetts, 1996; Vermes, 1999; Saraste, 1999; Hrgovic *et al.*, 2000). Gambar 2.3.1. berikut menunjukkan tahap-tahap yang terjadi pada sel limfosit yang mengalami apoptosis. Sel ini diambil sebagai model karena dalam keadaan normal, selama pertumbuhan populasi sel limfosit B, dari 100 sel 95 diantaranya akan mati karena berbagai alasan dan untuk berbagai tujuan (Cohen, 1993).



Gambar 2.3 1. Tahap-tahap apoptosis pada sel limfosit (Cohen, 1993)

The stages of apoptosis in a lymphocyte. These stages are best seen in isolated culture, in vitro phagocytosis will interfere. (a) The normal cell has a sparse cytoplasm and heterogenous nuclear chromatin. Cell volume is about 20 fl. (b) The cell has lost some volume and its cytoplasmic organelles are now tightly packed. There is clumping of chromatin. At this stage membrane changes that can lead to phagocytosis are present. (c) The cell exhibits blebbing. (d) The chromatin has collapsed down into clumps along the nuclear envelope. This is readily observed using cell-specific DNA dyes and a light microscope. Cell volume is now about 7 fl. (e) The nucleus has collapsed into a thick disk. (f) The collapsed nucleus frequently breaks up into spheres. Some DNA has presumably been lost from the cell by now, as apoptotic vesicles are blebbing out of it. (g) The cell has disintegrated into apoptotic bodies. Each of these contains fragments of cell disk for some time (Cohen, 1993).

Selanjutnya, sel-sel yang mengalami nekrosis dan apoptosis dapat dibedakan atas dasar beberapa faktor yang dapat diamati secara morfologik. Tabel 2.3.1 berikut menjelaskan beberapa ciri dan perbedaan yang penting antara nekrosis dan apoptosis. Faktor-faktor tersebut dapat dan bahkan seringkali dijadikan patokan dasar pada proses pengamatan dan penghitungan sel-sel yang mengalami apoptosis dalam berbagai jenis sediaan jaringan.

Tabel 2.3.1 Perbedaan antara nekrosis dan apoptosis

	Nekrosis	Apoptosis
Ukuran sel	Sel membesar lalu pecah, isi sel keluar ke jaringan sekitar, memicu terjadinya reaksi peradangan	Ukuran sel mengecil, sitoplasma memadat, organela tetap utuh tetapi tersusun lebih padat
Kondensasi kromatin	Granulasi kromatin, Karyolysis	Agregasi kromatin di pinggir nukleus di bawah membran inti membentuk masa yang tegas dengan berbagai bentuk dan ukuran
Perubahan pada sitoskeleton	Isi sel bocor / rusak, tidak terbentuk badan apoptotik (<i>apoptotic bodies</i>)	Terbentuk <i>apoptotic bodies</i> , (dimulai pembentukan gelembung sitoplasma, lalu terbagi menjadi gelembung-gelembung kecil yang terbungkus membran plasma, berisi sitoplasma dan organel, dengan/ tanpa fragmen nukleus
Fagositosis	Oleh sel-sel radang netrofil dan makrofag	Oleh makrofag sel-sel endotel dan parenkim di sekitarnya

(Vermes, 1999)

2.3.2. Apoptosis pada berbagai jenis sel tubuh

Dalam perkembangan lebih lanjut diketahui bahwa proses apoptosis dapat dijumpai pada berbagai jenis sel tubuh. Proses tersebut dapat terjadi pada berbagai peristiwa biologik, baik yang bersifat fisiologik maupun patologik seperti yang tertera di Tabel 2.3.2

Tabel 2.3.2. Apoptosis pada berbagai sel tubuh

- a. Rusaknya berbagai jenis sel secara terprogram selama embriogenesis, termasuk proses implantasi dan organogenesis. Proses organogenesis yang normal terjadi atas dasar keseimbangan yang dicapai antara proliferasi, diferensiasi dan apoptosis sel (Cunningham, 1997; Cotran, 1999).
- b. Perkembangan sel-sel neuron pada sistem syaraf pusat mamalia (Hetts, 1998).
- c. Involusi yang dipengaruhi oleh hormon, seperti yang terjadi pada orang dewasa, misalnya pada penstawa menstruasi atau regresi kelenjar mammae pada ibu semasa periode laktasi dan setelah tidak menyusui bayinya lagi (Cohen, 1993; Cotran, 1999).
- d. Kemaban sel-sel imun baik limfosit T maupun limfosit B, setelah adanya penurunan kadar sitokin tertentu (Cohen, 1993; Cotran, 1999).
- e. Atrofi patologik yang juga dipengaruhi oleh hormon, seperti atrofi kelenjar prostat setelah kastrasi (Cotran, 1999).
- f. Kematian sel yang terjadi pada proses keganasan, yaitu pada periode regresi tumor (Cotran, 1999)
- g. Kematian sel yang disebabkan oleh berbagai rangsangan penyebab nekrosis dalam dosis rendah, misalnya panas, radiasi, hipoksia, obat anti kanker, sitostatik dan sebagainya (Cotran, 1999).
- h. Kematian sel karena beberapa jenis infeksi virus tertentu; misalnya pada hepatitis virus, sel-sel hati yang mengalami apoptosis dikenal sebagai *Councilman bodies* (Steller, 1995; Cotran, 1999).
- i. Kematian sel-sel neutrofil selama respon peradangan akut (Cotran, 1999).
- j. Kematian sel yang diinduksi oleh sel T sitotoksik seperti pada reaksi penolakan transplantasi (*graft*) (Cotran, 1999)

Dan uraian di dalam Tabel di atas dapat disimpulkan bahwa, apoptosis dapat terjadi setiap saat, pada semua jenis sel dan pada derajat serta laju kecepatan yang berbeda. Semua itu dikendalikan oleh mekanisme yang dipengaruhi oleh tinggi rendahnya kadar hormon dan sitokin yang memicu dan menghambat apoptosis (*apoptotic and anti-apoptotic cytokines*) atau faktor-faktor pertumbuhan (*growth factors*) yang lain (Cotran, 1999; Haanen, 1999)

2.3.3. Tahap-tahap pada proses Apoptosis

Berdasarkan percobaan pada cacing *Caenorhabditis elegans*, diketahui bahwa pada dasarnya proses apoptosis dapat dibagi menjadi 4 tahap, yaitu tahap inisiasi, implementasi, fagositosis dan degradasi. Pada tahap inisiasi, sel menerima sinyal untuk apoptosis. Pada tahap implementasi, rangkaian proses apoptosis yang melibatkan berbagai caspase dan endonuklease yang mulai aktif, tetapi proses ini masih dapat balik. Tahap fagositosis melibatkan sel-sel fagosit yang memakan badan-badan apoptotik, dan selanjutnya diikuti dengan proses degradasi, suatu keadaan tidak dapat balik, yang melibatkan berbagai enzim protease dan endonuklease yang dipengaruhi oleh ion Ca^{++} di dalam makrofag dan sel-sel tetangga (Soini, 1998; Hrgovic *et al.*, 2000).

Selanjutnya, secara skematis apoptosis dapat diterangkan sebagai suatu titik akhir dari proses molekuler, yaitu berupa *energy-dependent cascade* yang dipicu oleh beberapa rangsangan tertentu. Seperti telah disebut di atas, proses tersebut terdiri dari empat tahapan dan komponen yang terpisah tetapi saling tumpang tindih yaitu : (Gambar 2.3.2.)

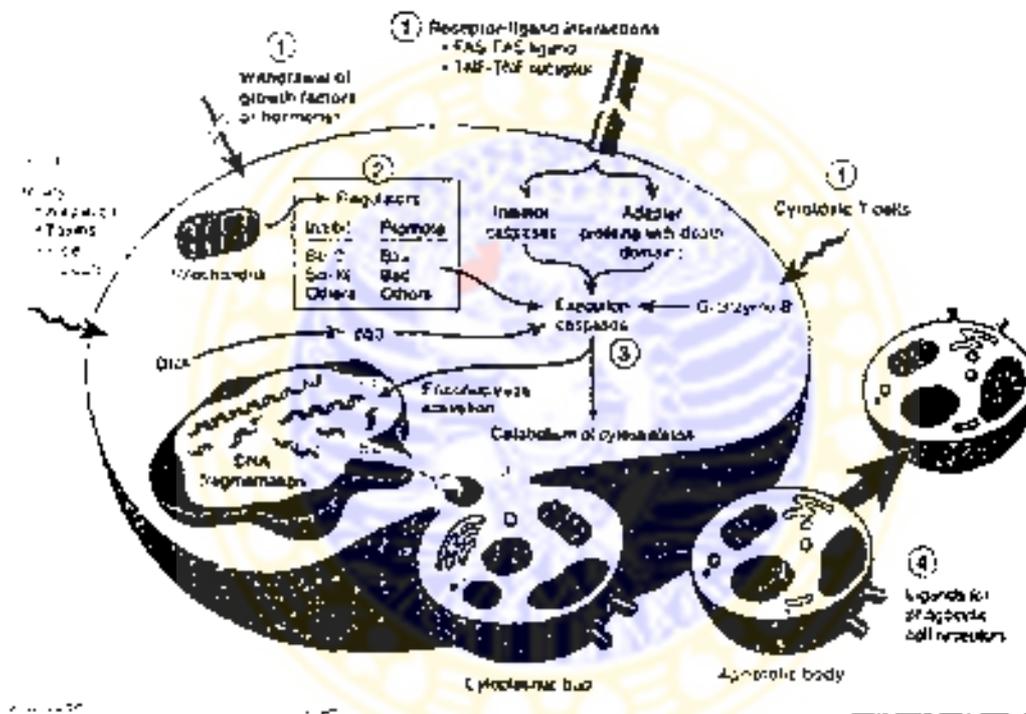
2.3.4.1. Jalur sinyal yang memicu apoptosis (1), yang meliputi:

- Rangsangan atau rudapaksa dari luar, seperti radiasi atau toksin.
- Sinyal transmembran yang dapat menjadi penentu rangsangan positif atau negatif terhadap apoptosis; misalnya penurunan mendadak kadar faktor pertumbuhan, hormon atau sitokin tertentu, atau sebaliknya.
- Sinyal transmembran lain yang melibatkan reseptor ligan.
- Sinyal intraseluler yang melibatkan pengikatan glukokortikoid dengan reseptor int karena rangsangan panas hipoksia dan infeksi. Juga termasuk sinyal yang dipicu oleh sel-sel limfosit T-sitotoksik.

2.3.3.2. Kontrol dan integrasi, di mana sistem pengaturan intraseluler yang bersifat positif dan negatif dapat mempercepat, menghambat atau mengistirahatkan apoptosis, sehingga menentukan hasilnya (2).

2.3.3.3 Fase eksekusi umum, berisi program kematian sel sebenarnya yang dilengkapi dengan caspase yang melibalkan berbagai enzim protease (3).

2.3.3.4. Pembersihan sel-sel yang mati dengan fagositosis (4).



Gambar 2 3 2. Gambaran skematik peristiwa apoptosis (Cotran, 1999).

Apoptosis dapat terjadi karena berbagai jenis stimulus, misalnya radiasi (radiasi ionisasi, radikal bebas), penurunan hormon atau faktor pertumbuhan secara mendadak, interaksi antara reseptor-ligan (Fas-FasL, TNF-TNFR), atau sel-sel T sitotoksik yang mengaktifkan caspase. Kontrol dan pengaturan apoptosis dipengaruhi oleh protein yang tergolong famili Bcl-2 yang dapat menghambat (misalnya Bcl-2 dan Bcl-XL) atau mempercepat kematian sel (misalnya Bax dan Bad). Akhir dan caspase mengaktifkan endonuklease dan protease dalam sitoplasma yang merusak kerangka sel (*cytoskeleton*) dan protein inti. Hasil akhir kaskade ini adalah badan apoptotik yang berisi berbagai komponen organel intrasel dan sitosol yang lain. Badan-badan ini juga mengekspresi ligan baru yang diperlukan untuk pengikatan dan penangkapan oleh sel fagosit (Cotran 1999)

2.3.4. Faktor-faktor yang berperan dalam pengendalian apoptosis

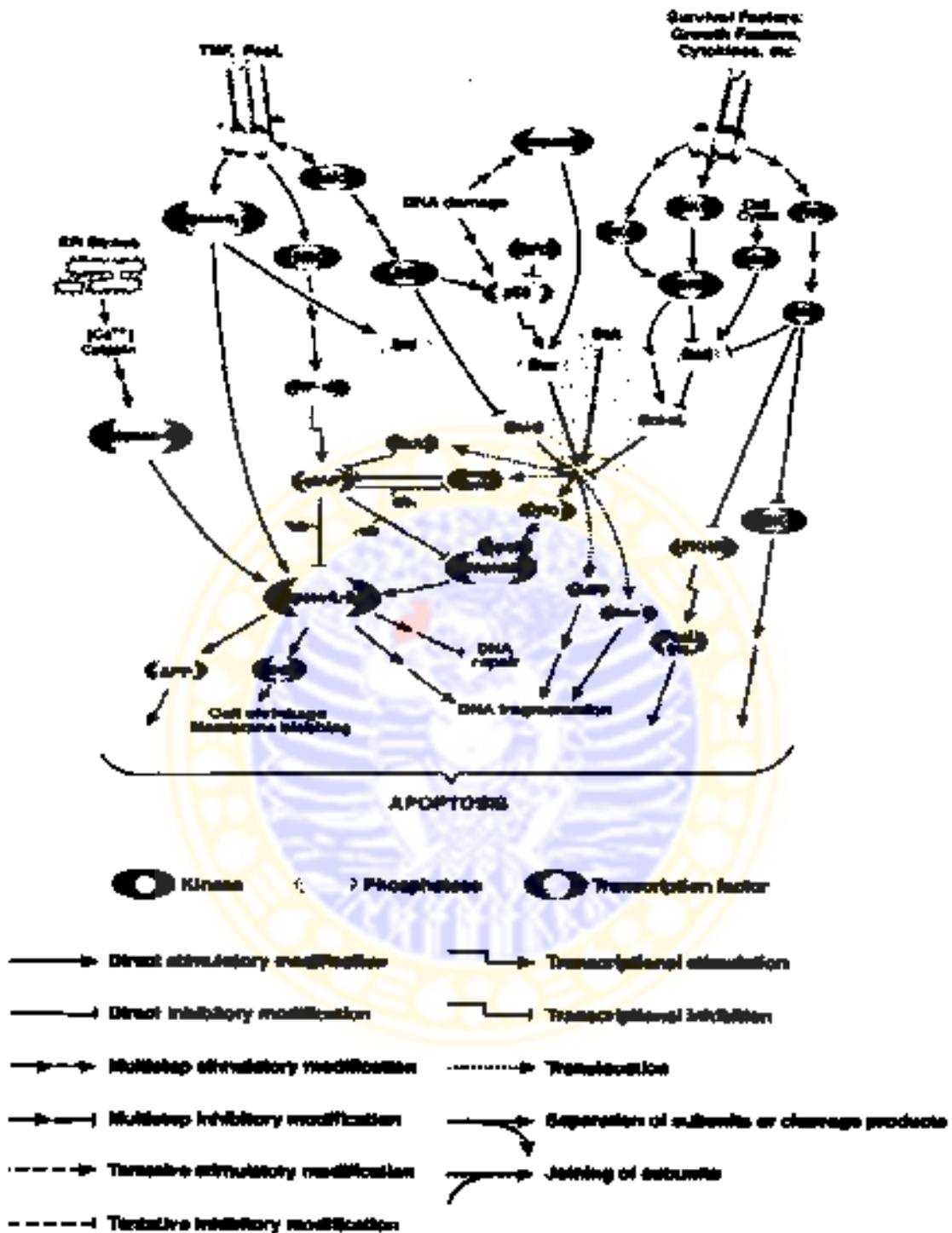
Dalam kondisi normal, apoptosis diinduksi atau dihambat oleh sinyal-sinyal eksternal melalui interaksi antar sel dan oleh mekanisme biologik intraseluler. Selama kehidupan berlangsung, berbagai bentuk kematian sel yang diinduksi oleh faktor-faktor kimia, toksin, radiasi ionik *reactive oxygen species* (ROS) aging atau iskemia, ikut mengaktifkan program apoptosis. Apoptosis sangat sedikit dijumpai pada kondisi keganasan, infeksi virus yang persisten, atau pada penyakit-penyakit auto-imun. Sebaliknya, apoptosis banyak dijumpai pada kondisi defisiensi imun atau degenerasi. Faktor-faktor lain yang ikut serta memicu terjadinya apoptosis yaitu adanya reseptor pada membran sel terhadap faktor-faktor pertumbuhan, interleukin, hormon steroid dan lemak dalam sitoplasma. Pemberian glukokortikoid untuk limfosit mengaktifkan program kematian sel. Kekurangan hormon tertentu menyebabkan apoptosis jaringan organ target. Sebaliknya, pada jaringan target yang lain, keberadaan yang terus menerus dan *colony stimulating factors* (CSF's), *nerve growth factor* (NGF), *transforming growth factor* (TGF), *platelet derived growth factor* (PDGF), *endothelial growth factor* (EGF), justru diperlukan guna menekan kematian sel secara apoptosis (Haanen, 1999, Reutelingsperger, 1999).

Ditinjau dari bidang molekuler, pada dasarnya apoptosis diatur oleh tiga gen, yaitu CED-3 dan CED-4 yang bertindak sebagai pengatur positif terhadap apoptosis dan CED-9 yang bersifat anti-apoptosis (Soini, 1998; Ashkenazi, 1998; Hrgovic, 2000). Ada sekelompok enzim protease cystein, disebut *Caspases* (*Cysteine-aspartic acid proteases*) yang kemudian diketahui bahwa mereka merupakan komponen utama yang berperan dalam rangkaian proses apoptosis. *Caspase* dihubungkan dengan apoptosis dengan adanya penemuan bahwa

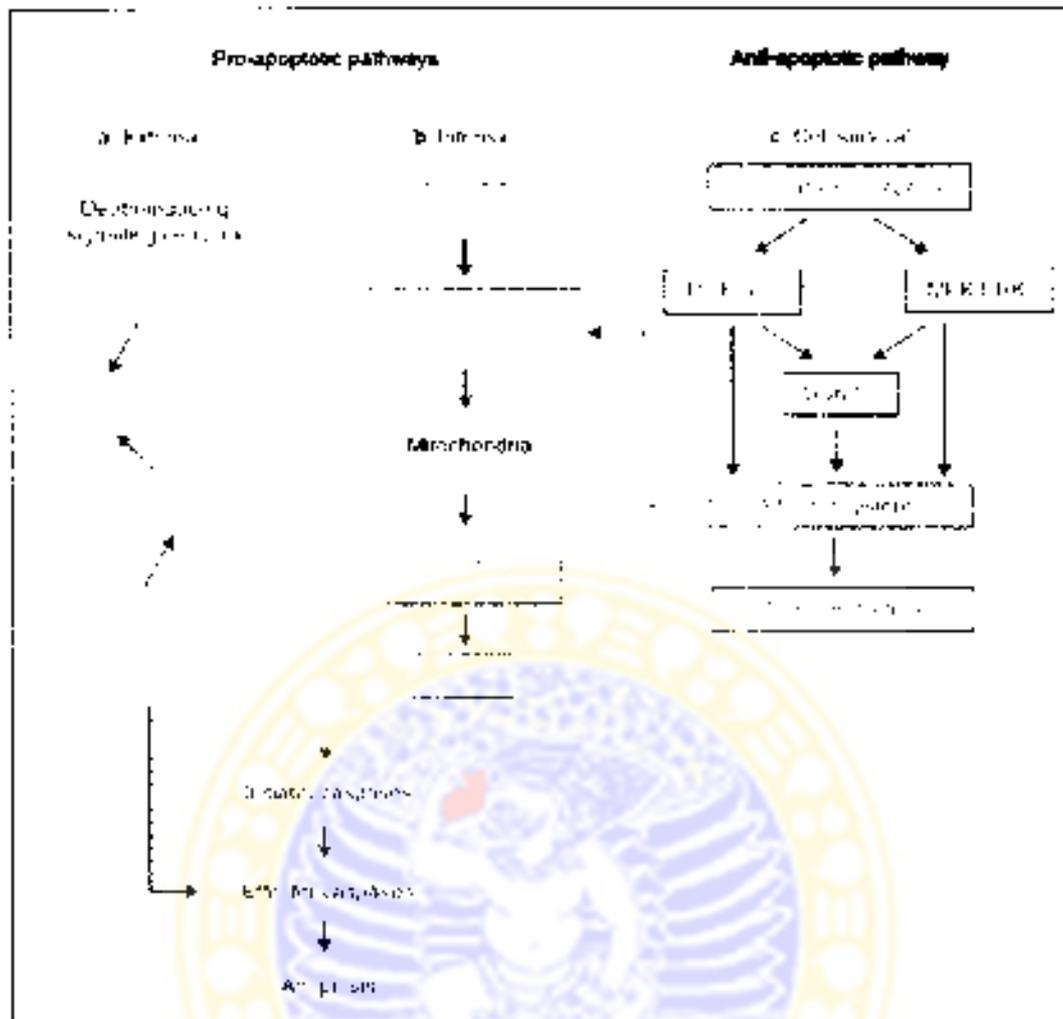
CED-3, suatu produk dan gen yang diperlukan dalam proses kematian sel pada cacing *Caenorhabditis elegans*, berhubungan dengan *interleukin-1 β -converting enzyme* (ICE atau *caspase*) pada mamalia. Ternyata *caspase* ditemukan pada berbagai organisme, mulai dari *Caenorhabditis elegans* sampai pada manusia (Ashkenazi, 1998; Thornberry, 1998). Dari 13 *caspase* yang telah diidentifikasi dan diberi nama mulai *caspase-1* sampai dengan *caspase-13*, telah diketahui peran masing-masing di dalam proses apoptosis dan peradangan. *Caspase* yang tergolong initiator, yaitu *caspase 8, 9, 10* dan *12*, setelah teraktivasi dan berpasangan erat dengan sinyal-sinyal pro-apoptotik, segera pecah dan mengaktivasi *efector caspases* yang berada pada jalur di bawahnya (yaitu *caspase 3, 6* dan *7*). Aktivasi ini menyebabkan pecahnya kerangka sel dan protein-protein inti dan proses apoptosis terjadi. Jalur lain yang dapat dilewati adalah *Cytochrome C* yang keluar dari mitokhondria, berpasangan dan mengaktivasi *caspase 9* yang menjadi kunci dari *initiator caspase*. Rangsangan proapoptotik meliputi: *FasL*, *TNF*, *DNA damage* dan *ER-stress*. *Fas* dan *TNFR* mengaktivasi *caspase 8* dan *10*. *DNA damage* memicu aktivasi *caspase 9*, dan *ER stress* memicu aktivasi *caspase 12* yang diperantarai ion Ca^{++} .

Peningkatan kadar IFN γ dapat memicu terjadinya apoptosis melalui jalur ekstrinsik, yaitu terbentuknya *Fas-Fas ligand* atau *TNF-TNF receptor complex* yang berasal dari ikatan antara reseptor dengan protein adaptor yang mengandung *death domain* (FADD) yang akan mengaktivasi *effector caspases*. Rangkaian dan pengendalian peristiwa apoptosis tersebut dapat dilihat pada Gambar 2.3.3 (Thornberry, 1998; Anonymous, 2003b) dan Gambar 2.3.4 (Rowe and Chuang, 2004) di bawah ini.

Overview: Regulation of Apoptosis



Gambar 2.3.3.. Mekanisme pengendalian molekuler pada apoptosis
 Dan <http://www.cellsignal.com> reference 2003



Gambar 2.3.4.. Ringkasan jalur pengendalian apoptosis (Rowe and Chuang, 2004).

Ada 3 jalur yang menentukan nasib sel, yaitu jalur ekstrinsik (hijau), intrinsik (biru) dan kehidupan sel (merah) (a) Jalur ekstrinsik berpusat sekitar *death receptors*, pada Gambar ini dicontohkan oleh Fas ligan (FasL) sebagai hasil ikatan *cytosolic death domain* dan reseptor dengan protein adaptor (FADD) yang berisi *death domain*. Protein adaptor juga memiliki *death effector domain* di mana caspase dapat mengikat. Ke-empat molekul (*ligand, death receptor, protein adaptor dan caspase*) seluruhnya membentuk *death inducing signaling complex* yang mengaktifasi *effector caspases* (caspase 3, 6 dan 7); (b) Jalur intrinsik berpusat pada keutuhan mitokondria, yang dipelihara oleh family Bcl-2, yang sebagian anggotanya bersifat pro-apoptotic dan sebagian lain bersifat anti-apoptotic. Rasio antara famili Bcl-2 yang bersifat pro- dan anti-apoptotic ini diatur dengan ketat oleh gen p53 di antara molekul-molekul yang lain. Bila rasio Bcl-2 cenderung kearah pro-apoptosis, integritas membrane mitokondria menurun dan faktor-faktor pro-apoptosis seperti *cytochrome-c* dilepaskan. *Cytochrome-c* berikatan dengan Apaf-1 dan kompleks ini mengaktifasi *inhibitor caspases* dan kemudian mengaktifasi *effector caspases*; (c) Jalur kehidupan sel bermula dari aktivasi *cell surface receptors* seperti TrkB, yang mengaktifasi P13K/Akt dan MEK/ERK. Kedua jalur ini menghambat aktivitas GSK-3 β . Bila pengaturan terjadi melalui jalur (c) ini, maka P13K/Akt, MEK/ERK dan GSK-3 β merangsang aktivitas sejumlah besar dari sistem efektor, termasuk anggota famili Bcl-2, menuju ke apoptosis. (Apaf-1 = Apoptosis protease activating factor 1; DISC = death-inducing signaling complex. ERK = extracellular-signal-regulated kinase. FADD=Fas-associated death domain protein. GSK-3 β = glycogen synthase kinase 3 β . MEK = mitogen-activated protein kinase. P13K/Akt = phosphatidylinositol 3-kinase/Akt

2.3.5. Deteksi dan pengukuran apoptosis pada sediaan irisan jaringan

Identifikasi sel-sel yang mengalami apoptosis pada sediaan irisan jaringan selain sangat bervariasi dan tergantung kepada individu yang melakukan pengamatan (*inter-observer variation*); juga sangat ditentukan oleh kemampuan mikroskop dan pembesarannya. Karena itu untuk memperoleh hasil pengamatan yang lebih baik, perlu pengamatan dengan pembesaran yang lebih besar (Pizem and Cor, 2003). Deteksi sel-sel yang mengalami apoptosis dilakukan atas dasar perubahan morfologi spesifik pada pengamatan dengan mikroskop cahaya biasa, dan dengan pengecatan rutin. Sekarang telah banyak dikembangkan berbagai teknik yang lebih teliti, khususnya untuk mendeteksi apoptosis pada irisan jaringan berdasarkan perubahan-perubahan biokimiawi spesifik yang terjadi, atau ekspresi protein-protein tertentu yang berhubungan dengan apoptosis. Teknik-teknik tersebut dipilih sesuai dengan model kajian, jenis sampel, kebutuhan dan tujuan penelitian serta kemampuan dan daya dukung yang lain (Soini, 1998; Barret, 2003; Sanchez-Torres, 2003).

Beberapa teknik yang telah dikenal dan sering digunakan untuk mendeteksi dan sekaligus mengukur derajat apoptosis pada berbagai penelitian antara lain adalah.

2.3.5.1. Elektroforsis DNA

Teknik ini bersifat kualitatif, yang dikembangkan atas dasar ekstraksi dan pemurnian DNA sel yang dipisahkan dengan teknik elektroforsis. Gambaran anak tangga berupa *DNA-ladder*, yang berasal dari pemecahan DNA menjadi fragmen-fragmen sepanjang 180 sampai 200 bp merupakan fenomena spesifik yang hanya dijumpai pada apoptosis dan berbeda dengan proses nekrosis di mana pemecahan DNA terjadi secara acak (Soini, 1998; Sanchez-Torres, 2003)

2.3.5.2. Mikroskopik

Pada dasarnya apoptosis dapat dideteksi pada sediaan insang janingan biasa yang dicat dengan pewarnaan rutin seperti hematoksilin-eosin (HE), asalkan kualitas sediaan dan mikroskopnya memungkinkan. Dengan teknik ini deteksi sel-sel yang apoptotik didasarkan atas gambaran morfologik yang spesifik seperti yang telah diuraikan pada bab. 2.3.1 dan Tabel 2.3.1. Bila kualitas sediaan dan teknik pewarnaannya cukup baik, dilakukan oleh pengamat yang berpengalaman serta dengan cara pengamatan yang teliti, dari sediaan HE justru dapat diperoleh hasil yang lebih baik. Hal ini tidak mustahil, karena dengan sediaan ini seluruh tahapan dan proses apoptosis dapat diidentifikasi dan dipelajari dengan seksama (Soini, 1996; Cotran, 1999; Pizem and Cor, 2003; Sanchez-Torres, 2003).

2.3.5.3. Metoda TUNEL

Metoda TUNEL (*terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated-dUTP nick end labelling*) adalah suatu metoda yang dikembangkan atas dasar *in situ* 3'-end labelling method, yaitu dengan melabel ujung bebas molekul DNA yang radioaktif maupun non-radioaktif. Dengan metoda ini maka identifikasi sel-sel apoptotik secara individu dapat dilakukan dengan lebih akurat. Metode ini digunakan untuk menilai dan mengukur derajat apoptosis pada sediaan insang janingan (Soini, 1998; Pizem and Cor, 2003; Sanchez-Torres, 2003).

Saat ini telah banyak beredar kit-kit komersial yang mengacu kepada deteksi fragmen-fragmen DNA tersebut (Pizem and Cor, 2003). *Apoptotag[®] in situ apoptosis detection kits* adalah salah satu produk reagen, yang didesain untuk mendeteksi sel apoptosis *in situ*, dengan melabel gugus 3-OH bebas yang berada di ujung molekul fragmen DNA pada peristiwa apoptosis. Nukleotida-

nukleotida yang berada di dalam bufer dan dilabel dengan *digoxigenin* atau *fluorescein* secara enzimatik ditambahkan kepada DNA oleh *terminal deoxy-nucleotidyl transferase* (Tdt). Tdt mengkatalis penambahan dari nukleotida ke ujung gugus 3'-OH molekul DNA untai ganda maupun untai tunggal. Nukleotida-nukleotida yang sudah terikat akan membentuk satu oligomer yang tersusun oleh nukleotida *digoxigenin* atau *fluorescein* dan nukleotida yang tidak dilabel. Selanjutnya fragmen-fragmen DNA yang dilabel dengan nukleotida-*digoxigenin* akan mengikat antibodi anti-*digoxigenin* yang telah dikonyugasikan dengan *peroxidase* di tempat terjadinya reaksi. Ikatan enzimatik *peroxidase-antibody-conjugate* akan menghasilkan warna sesuai dengan substrat khromogen, dan ikatan terwama ini dapat diamati secara imuno-histokimia atau imunositokimia. Alternatif lain untuk *fluorescein* yang terikat dapat pula dideteksi dengan menggunakan *flow cytometry* atau *fluorescence microscopy* (Anonymous, 1998; Sanchez-Torres, 2003).

2.3.6.4. Deteksi ekspresi enzim caspase-3 dengan metode imunohistokimia

Dengan meningkatnya pengetahuan tentang mekanisme molekuler dari apoptosis, deteksi sel apoptotik berdasarkan morfologi dan deteksi fragmentasi DNA sekarang berkembang ke arah metoda-metoda yang lebih spesifik. Protein-protein yang teraktivasi secara selektif, atau fragmen-fragmen protein yang dihasilkan selama proses apoptosis, telah dapat diidentifikasi, dan antibodi yang spesifik untuk protein-protein tersebut dapat didesain untuk mendeteksi sel-sel apoptotik dan membedakannya dengan sel-sel nekrotik (Pizem and Cor, 2003).

Dalam kondisi normal, apoptosis diinduksi atau dihambat oleh sinyal-sinyal eksternal melalui interaksi antar sel, dan oleh mekanisme biologik intrasetuler.

Infeksi akut yang menyebabkan meningkatnya kadar berbagai sitokin yang bersifat pro-inflamasi termasuk IFN- γ , memicu terjadinya apoptosis melalui jalur ekstrinsik yang melibatkan 4 kelompok molekul, yaitu *ligand*, *death receptors*, *adaptor proteins* dan sekelompok enzim protease cistein yang disebut *Caspases* (*Cysteine-aspartic acid proteases*). *Caspases* adalah segolongan enzim protease yang memecah protein yang menjadi target pada gugus sisa asam aspartat. Saat ini dikenal paling sedikit dikenal ada 12 *caspases*, yang diketahui berperan sebagai komponen utama dalam rangkaian proses apoptosis. Beberapa *caspase* yang tergolong *initiator caspases* (*caspase 8, 10 dan 12*) yang teraktivasi melalui jalur ekstrinsik dan *caspase 9* melalui jalur intrinsik berikatan dengan sinyal-sinyal pro-apoptotik, dan membentuk *death inducing signaling complex* yang mengaktivasi *effector caspases* yang berada di bawahnya (*caspase 3, 6 dan 7*) (Budiharto, 1999, Anonymous, 2003b, Rowe and Chuang, 2004).

Caspase 3 merupakan *caspase* efektor utama yang teraktivasi selama hampir seluruh proses apoptosis. Aktivasi *caspase-3* secara langsung atau tidak langsung bertanggung jawab terhadap pemecahan protein target, menuju pemecahan DNA yang spesifik dan perubahan morfologi yang spesifik pula dari sel-sel apoptotik. Pada saat *caspase 3* sudah aktif, sel tersebut telah benar-benar *committed to death* dan apoptosis sudah dapat dikatakan menuju ke kondisi yang tidak dapat kembali lagi (*the point of no return*) (Gambar 2.3.3.). Penampilan atau ekspresi bentuk aktif dari *caspase 3* di dalam sel terjadi pada awal proses apoptosis dan mendahului perubahan gambaran morfologi yang klasik. Deteksi peningkatan ekspresi enzim *caspase 3* di dalam sel melalui pemeriksaan imunohistokimia, dapat dijadikan dasar untuk mendeteksi sel-sel yang mengalami apoptosis (Pizem and Cor, 2003, Sanchez-Torres, 2003).

2.3.5.5. Indeks apoptosis

Indeks apoptosis adalah metode lain untuk mengukur derajat apoptosis, yaitu dengan menghitung persentase sel yang mengalami apoptosis dibanding seluruh sel. Beberapa penulis menggunakan cara ini untuk menunjukkan jumlah sel apoptotik per 1000 sel. Karena sel-sel apoptotik seringkali berada dalam kelompok, maka diperlukan pengamatan pada lapangan pandang dalam jumlah yang cukup representatif untuk dikutsertakan dalam analisis. Untuk menjamin representasi dan mengurangi kesalahan hasil, diperlukan pengamatan pada kurang lebih sejumlah 20 lapangan pandang dengan pembesaran 1000 kali. Jumlah ini sudah berisi lebih kurang 1000 -1500 sel (Somri, 1998, Pizem and Cor, 2003).

2.3.6. Peranan apoptosis dalam berbagai kondisi klinis

Akhir-akhir ini peranan apoptosis dalam berbagai kondisi sakit makin banyak menjadi topik pembahasan dan penelitian klinik. Berbagai sindroma patologik yang tidak dapat diterangkan dengan pendekatan biologi sel biasa, ternyata dapat didekati melalui proses apoptosis. Apoptosis yang tidak sempurna merupakan hal yang penting untuk menerangkan patogenesis terjadinya kanker, karena kematian sel yang terganggu memberi kesempatan bagi sel-sel yang mengalami mutasi untuk terus tumbuh menjadi tumor. Apoptosis bertanggung jawab dalam menyingkirkan sel-sel limfosit yang *autoreactive*, seperti halnya dalam menyingkirkan limfosit aktif setelah selesainya respon kekebalan. Sebaliknya, peningkatan apoptosis dapat dijumpai pada jaringan target setelah terjadinya penurunan kadar hormon, misalnya gangguan sistem hematopoiesis pada anemia

aplastik, penyusutan jaringan tumor setelah radiasi atau pemberian obat-obat sitostatik, proses penuaan dan AIDS (Reutelingperger, 1999, Haanen, 1999).

2.3.6.1. Apoptosis pada penyakit infeksi

Ekspresi program kematian sel yang adekuat merupakan hal yang sangat penting dalam pencegahan pertumbuhan sel yang berlebihan dan penyembuhan dari suatu kondisi peradangan setelah terjadi infeksi. Pada berbagai penyakit infeksi, apoptosis sebagian besar diatur oleh sel-sel limfosit T melalui jalur *cytotoxic T-lymphocyte (CTLs) stimulated apoptosis* (Gambar 2.3.1).

Sebagaimana telah diketahui, sistem kekebalan berfungsi mempertahankan tubuh terhadap infeksi dan keganasan. Substansi kimia yang merangsang respon imun disebut antigen. Antigen inilah yang menjadi pemicu peningkatan respon imun dan proliferasi sel-sel limfosit T maupun B. Mula-mula antigen yang dikenali oleh sel-sel T dipresentasikan pada permukaan sel yang terinfeksi. Mereka meng-ekspresikan *Fas ligand* di permukaan dan membunuh sel-sel target dengan mengikat reseptor Fas. Kemungkinan lain, CTLs menginduksi apoptosis sel target dengan mensekresi *perforin*, suatu molekul *transmembrane pore-forming*, dan sekaligus mengeluarkan granula-granula sitoplasmik ke arah sel target. Sejenis protease yang disebut *granzyme B*, adalah komponen sitotoksik yang penting dalam proses ini. *Granzyme B* mempunyai kemampuan untuk memotong protein pada sisa aspartat dan mampu mengaktifkan berbagai *caspase* sel. Pada Gambar 2.3.1. dapat dilihat bahwa dengan jalan ini, CTL membunuh sel target dengan menerobos jalur awal sinyal dan langsung menginduksi fase efektor dari apoptosis (Haanen, 1999, Cotran, 1999).

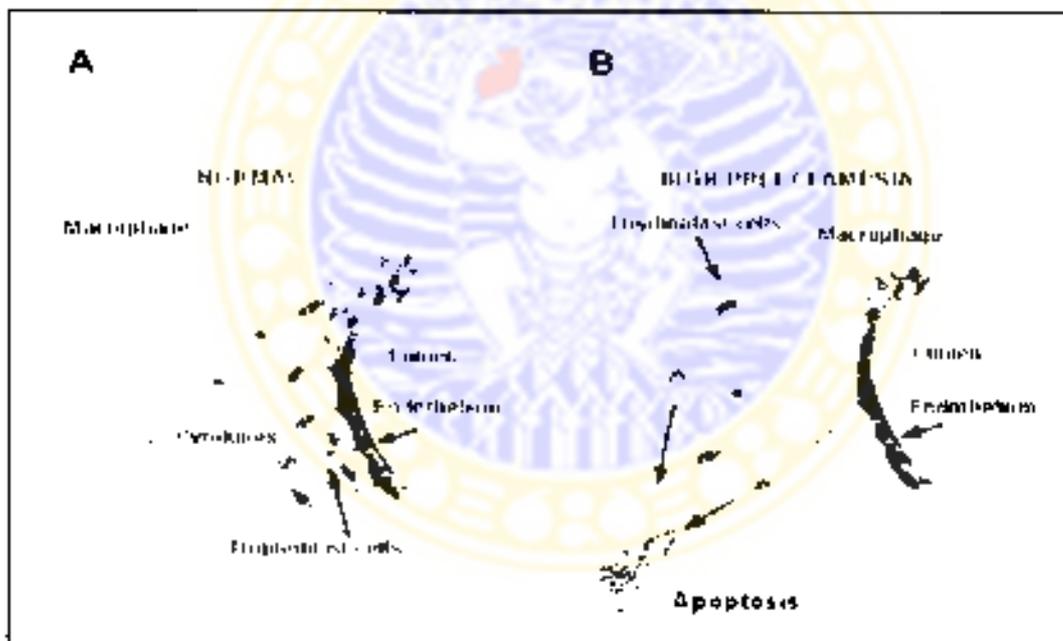
Apoptosis pada penyakit infeksi juga dapat melalui jalur yang dipengaruhi peran sitokin. Sitokin-sitokin pro-inflamasi seperti IL-2, TNF α dan IFN- γ yang timbul sebagai respon terhadap infeksi akut ternyata juga bersifat apoptotik, tidak saja terhadap sel target yang mengalami infeksi, tetapi juga terhadap sel-sel lain yang sedang berproliferasi. Telah dikemukakan bahwa berbagai kondisi infeksi yang disebabkan oleh virus, bakteri ataupun parasit yang terjadi selama kehamilan, menyebabkan tubuh berada dalam keadaan yang dilematis. Usaha tubuh untuk menyelamatkan diri terhadap infeksi justru dapat menimbulkan akibat yang merugikan terhadap kehamilan (Gambar 2.2.4).

2.3.6.2. Apoptosis pada kehamilan normal dan dengan komplikasi

Peristiwa apoptosis pada sel-sel jaringan plasenta telah ditemukan dan dikemukakan oleh berbagai peneliti (Kokawa, 1998a; Jerzak, 1999; Hirabayashi, 1999; Ejima, 2000; Qumsiyeh, 2000). Apoptosis sel-sel T desidua manusia pada trimester awal kehamilan, merupakan mekanisme untuk memelihara penyesuaian sistem kekebalan yaitu pertahanan diri terhadap penolakan alograf fetal oleh sistem kekebalan ibu (Jerzak, 1998; Jerzak, 1999). Laju dan derajat apoptosis yang terjadi pada sel-sel plasenta selama proses kehamilan bervariasi dan berfluktuasi sesuai dengan usia dan kondisi kehamilan. Indeks apoptosis pada sel-sel trofoblas dan desidua manusia pada kehamilan usia 37-42 minggu lebih tinggi secara bermakna dibandingkan pada kehamilan usia 23-30 minggu. Hal ini menunjukkan bahwa apoptosis pada sel-sel trofoblas dan desidua manusia terus berlangsung selama kehamilan, bahkan cenderung meningkat seiring dengan usia kehamilan (Smith *et al* 1997, Runic, 1998, Halperin 2000). Hal tersebut juga diperkuat dengan bukti bahwa derajat apoptosis sel-sel plasenta bayi aterm yang

lahir spontan tidak berbeda dengan plasenta bayi aterm yang lahir melalui tindakan pembedahan caesar (Thiet *et al.*, 2000). Dengan analisis molekuler kuantitatif, juga ditemukan bahwa apoptosis sel-sel desidua dan villi khorionik pada kasus-kasus abortus spontan lebih tinggi dibandingkan dengan pada kehamilan normal (Kokawa, 1998b; Hirabayashi, 1999; Qumsiyeh, 2000).

Telah disebutkan bahwa di tempat implantasi, makrofag mengisi 20-30% sel-sel desidua, dan tidak seperti sel-sel NK, jumlah sel-sel makrofag tersebut tetap tinggi selama kehamilan berlangsung (Loke and King, 1995; Mor and Abrahams, 2003). Gambar 2.3.5. berikut ini menunjukkan peran makrofag dan produksi sitokin-sitokin sebagai imunoregulator di tempat implantasi.



Gambar 2.3.5. Perbedaan distribusi makrofag dan produksi sitokin pada kehamilan normal dan kehamilan dengan komplikasi *IUGR* dan preeklamsi. (Mor and Abrahams, 2003).

Pada kehamilan normal, sel-sel makrofag berada di dalam stroma di sekitar arteria spiralis dan trofoblas ekstravillous(A). Pada pre-eklamsi sel-sel makrofag berada di dalam dan di sekitar arteria spiralis yang memisahkan mereka dengan sel-sel trofoblas.(B) Pada kondisi normal, makrofag menunjang kehidupan trofoblas, tetapi pada keadaan patologis justru menginduksi terjadinya apoptosis

Kondisi lokal di tempat implantasi tidak hanya ditentukan oleh jenis dan komposisi sel-sel yang ada, tetapi juga faktor-faktor terlarut yang diproduksi di tempat itu. Pada kehamilan normal sel-sel endotel uterus di sekitar blastosis mengalami apoptosis dan mengeluarkan sitokin-sitokin Th2. Sel-sel apoptosis ini menekan makrofag yang teraktivasi dalam hal produksi sitokin-sitokin Th1, sehingga terjadi peningkatan produksi sitokin Th2 seperti IL-10, IL-6 dan IL-4 yang bersifat anti-inflamasi dan immunosupresi. Suasana lingkungan ini menjamin kehidupan trofoblas (Gambar 2.3.5.A). Pada kondisi kehamilan yang mengalami komplikasi preeklamsia atau *intra uterine growth restriction (IUGR)*, makrofag yang teraktivasi mengeluarkan sitokin-sitokin pro-inflamasi seperti TNF α dan IFN γ dan menyebabkan apoptosis sel-sel trofoblas ekstravilous (Gambar 2.3.5.B). Dengan demikian dapat dijelaskan kenapa pada kehamilan dengan komplikasi *IUGR* atau preeklamsia, insiden apoptosis pada sel-sel plasenta ditemukan meningkat (Loke and King, 1995, Smith et al, 1997, Mor and Abrahams, 2003).

Selain itu, apoptosis pada sel-sel plasenta juga dipicu oleh berbagai bahan tertentu seperti lipopolisakarida (LPS) dan sikloposfamid (CP). LPS memicu apoptosis lebih cepat dibandingkan CP. Hal ini diketahui dari eksperimen yang dilakukan oleh Savion, dimana fragmentasi DNA yang terjadi pada uterus mencit hamil muncul berupa *DNA ladder* pada 24 jam setelah pemberian LPS dan 72 jam setelah pemberian CP (Savion, 2002).

Dari uraian berbagai kepustakaan di atas, dikemukakan konsep bahwa proses kelahiran bayi atau hasil konsepsi pada dasarnya adalah suatu peristiwa yang telah terprogram. Hasil berbagai penelitian yang terdahulu ternyata mendukung konsep teori bahwa penolakan hasil konseptus setelah masa

kehamilan tertentu disebabkan oleh adanya peristiwa apoptosis. Oleh karena itu dapat dipikirkan bahwa gangguan kehamilan dini seperti *abortus*, *preterm labor*, *IUGR*, lahir mati dan lahir cacat pada dasarnya merupakan akibat dari penolakan hasil konsepsi yang terjadi lebih awal dari program yang direncanakan semula. Dengan demikian maka pada kajian ini dikemukakan pemikiran bahwa berbagai hal atau faktor apa saja yang bersifat memicu terjadinya apoptosis, secara potensial dapat memicu terjadinya kegagalan kehamilan, dan oleh karenanya akan berpengaruh pada hasil kehamilan



2.4. Penggunaan hewan coba dalam penelitian

Yang disebut dengan hewan coba adalah satu atau beberapa spesies hewan yang dipelihara di laboratorium dalam kondisi, aturan serta untuk tujuan tertentu. Hewan tersebut tidak hanya meliputi hewan-hewan kecil seperti mencit, tikus, marmot dan kelinci, tetapi juga hewan-hewan lain seperti ayam, bebek, biri-biri, kambing, babi, sapi, kera dan sebagainya. Penggunaan hewa coba dalam penelitian merupakan langkah alternatif yang ditempuh sebelum sebuah perlakuan tertentu benar-benar diterapkan pada manusia. Dalam bidang kedokteran, selain untuk keperluan pendidikan rutin, hewan coba sering dipakai sebagai model penelitian atau percobaan yang berkaitan dengan diagnosis dan mempelajari patofisiologi penyakit, uji efektivitas dan toksisitas obat, vaksin dan sebagainya (Rugh, 1970; Smith and Mangkoewidjojo, 1987).

2.4.1. Alasan penggunaan mencit sebagai hewan coba

Kriteria penting yang perlu dijadikan dasar pertimbangan untuk memilih hewan tertentu sebagai model adalah kekerabatan antara sifat-sifat biologik yang dimiliki hewan tersebut dengan manusia. Berdasarkan hal tersebut maka hewan dari jenis mamalia lebih sering digunakan sebagai model penelitian dari pada jenis hewan yang lain. Kriteria penting yang lain adalah daya reproduksi dan daya tahan terhadap infeksi yang tinggi, harga yang murah serta kemudahan untuk memperoleh dan memelihara hewan coba. Ternyata mencit merupakan hewan yang cukup memenuhi syarat-syarat yang disebutkan di atas, sehingga sampai sekarang merupakan jenis hewan yang sering digunakan sebagai model penelitian, terutama dalam bidang biologi dan kedokteran (Rugh, 1970; Smith and Mangkoewidjojo, 1987; Penn, 1999).

2.4.1.1. Data biologik mencit

Mencit tergolong hewan pengerat (order *Rodentia*), karena mempunyai dua pasang gigi pengerat yang tajam dan dapat mengasah sendiri. *Rodentia* memiliki lebih dari 3000 spesies, dan hampir meliputi 40% dari seluruh populasi mamalia. Mencit rumah tergolong famili *Muridae* (*Old World Mice*) genus *Mus*, yang terdiri dari empat spesies, yaitu *Mus musculus*, *Mus domesticus*, *Mus castaneus* dan *Mus bactrianus*. Mencit berasal dari mencit liar, dari sub-spesies *Mus domesticus domesticus* (*Mus musculus domesticus*), yang ditangkap kemudian dipelihara oleh pecinta hewan pada abad ke 18-19 kemudian mulai dibawa ke laboratorium sejak awal abad ke-20. Mencit merupakan hewan pemakan segala (*omnivorus*) dan cenderung mengerat bahan apa saja, walaupun bukan bahan yang biasa dimakan. Berat badan mencit yang berumur 4 minggu adalah sekitar 18-20 gram dan dapat mencapai 30-40 gram bila sudah berumur 6 bulan atau lebih. Walaupun mencit lebih cenderung hidup pada suhu lingkungan yang tinggi, namun mereka masih dapat hidup dengan baik pada suhu yang rendah. Tabel 2.4.1 dan 2.4.2 menunjukkan sebagian data biologik mencit yang penting sehubungan dengan penggunaannya sebagai hewan coba. Karena sifat-sifat fisiologis dan genetik yang dimiliki banyak kemiripan dengan sifat-sifat fisiologis pada manusia, maka mencit mempunyai peranan yang sangat besar dalam riset-riset biomedik. Kemudahan pemeliharaan dan pembiakan serta penyesuaian diri dengan kondisi buatan di laboratorium (*artificial*), jangka waktu hidup yang cukup pendek (2-3 tahun), ukuran tubuh yang relatif kecil dan harga yang murah, menyebabkan mencit menjadi salah satu hewan pilihan untuk model penelitian di dunia medik, termasuk rekayasa genetika dan riset-riset ilmiah lainnya (O'Brien and Holmes 1993, Penn 1999, Anonymous, 2002).

Tabel 2.4.1. Data biologik mencit

Umur (<i>life span</i>)	1-2 tahun dapat sampai 3 tahun
Berat badan lahir	0,5 – 1 gram
Kecepatan pertumbuhan	1 gram/hari
Berat badan dewasa	Jantan: 20-40 gram; betina 18-35 gram
Umur dewasa / siap kawin	35 hari / 8 minggu (jantan dan betina)
Siklus seksual	Polyoestrus
Siklus birahi	4 – 5 hari
Lama waktu birahi	12 – 14 jam
Masa kebuntingan	19 – 21 hari
Type Plasenta	<i>Discoidal haemochorial</i>
Jumlah anak	Rata-rata 6, dapat mencaoi 15 ekor.
Lama waktu sapit	21 hari / 3 minggu
Temperatur (rektal)	35-39° (rata-rata 37,4 °C)
Volume darah	75-80 ml/kg
Sel darah merah/eritrosit	$7.7-12.5 \times 10^6 / \text{mm}^3$
Sel darah putih/leukosit	$6.0-12.0 \times 10^3 / \text{mm}^3$
Neutrofit	12-30%
Limfosit	55-85%
Monosit	1-12%
Eosinofi	0.2-4.0%
PCV	41-48%
Trombosit	$150-400 \times 10^3 / \text{mm}^3$
Hemoglobin	13-16 g/100 ml
Kebutuhan makanan	3 – 5 gram / ekor / hari

(Smith and Mangkoewidjojo, 1987)

2.4.1.2. Sistem reproduksi mencit dan perbandingannya dengan manusia

Mencit mempunyai daya tahan hidup dan daya reproduksi yang cukup tinggi. Pada usia 8 minggu mencit sudah menginjak dewasa dan siap untuk kawin. Mencit mempunyai siklus birahi yang berlangsung selama 4-5 hari dan terdiri dari tahap-tahap pro-estrus, estrus, met-estrus dan di-estrus. Tahap-tahap ini dapat dideteksi melalui pemeriksaan sel-sel epitel vagina dengan mikroskop. Adanya *vaginal plug* pada umumnya digunakan sebagai petanda bahwa telah terjadi

kopulasi. Kebuntingan berlangsung selama 19-21 hari, dengan jumlah anak rata-rata 5 – 15 ekor. Segera setelah melahirkan, dalam 12 jam mereka sudah siap untuk kawin lagi (*post partum oestrus*), dan mereka bisa bunting sambil menyusui anaknya sampai waktu sapih sekitar 21 hari (Tabel 2.4.1.). Mencit yang masih baru menginjak dewasa relatif lebih sulit bunting dibandingkan yang sudah pernah beranak (Rugh, 1970, Smith and Mangkoewidjojo, 1987; O'Brien and Holmes, 1993; Penn, 1999; Anonymous, 2002). Penggunaan mencit sebagai model penelitian dalam bidang embriologi cukup berbatasan. Selain faktor-faktor tersebut di atas, tipe plasenta mencit yang sama dengan manusia (*discoidal hemochorial*), umur kebuntingan mencit yang pendek, cukup memungkinkan bagi peneliti untuk melakukan pengamatan secara penuh selama masa kebuntingan (Rugh, 1970; Smith and Mangkoewidjojo, 1987; Cross *et al.*, 1994; Loke and King, 1995; Dupuy-Camet, 1997; Bemischke, 2002).

Tabel 2.4.2. Perkembangan embrio mencit dalam uterus pasca konsepsi

Hari ke	Peristiwa yang terjadi
0,5 - 1	- terbentuk <i>vaginal plug</i> , salah satu tanda terjadinya perkawinan. - sperma memasuki ovum, fertilisasi terjadi sempurna
1 - 1,5	- <i>polar body</i> terbentuk, memasuki tahap dua sel
1,5 - 2,5	- tahap empat sel atau lebih
3,5	- pembentukan blastosist
4,25 - 4,5	- aktivasi blastosist
4,5 - 6	- tahap implantasi - pemisahan antara dua lapisan germinal primer
6 - 8	- pembentukan kantung amnion dan sirkulasi vitelin - tiga lapisan germinal terbentuk dan mulai berdiferensiasi
9 - 10	- perkembangan plasenta
8 - 18	- perkembangan sirkulasi fetus - pembentukan dan perkembangan organ
20 - 21	- lahir

(Rugh, 1970, Cross, 1994)

Tabel 2.4.3. Perkembangan embrio manusia pasca konsepsi

Hari ke -	Peristiwa yang terjadi
0.5 - 1	- sperma memasuki ovum, fertilisasi terjadi
2	- tahap dua sel (30 jam), 4 sel (40 jam)
3	- pembentukan morula
4	- pembentukan blastosist
6 - 7	- implantasi mulai terjadi
8	- pemisahan antara dua lapisan germinal primer
8 - 12	- hasil konsepsi secara bertahap ditutupi oleh jaringan maternal, pembuluh darah plasenta primitif mulai terbentuk
13	- sirkulasi uteroplasenta mulai berjalan
14	- terbentuk "primitive streak". → keluar sel-sel embrionik lapisan ke-3
15 - 20	- tiga lapisan embrionik terbentuk sempurna, pembentukan dan perkembangan organ, pembentukan notochord, ektoderm membentuk neural plate, mesoderm mulai membelah menjadi beberapa segmen, kelak akan menjadi rusuk, otot dan sebagainya
Minggu 3 - 8	- perkembangan neural tube dan pembentukan organ-organ (tangan, kaki, ekor, paru, liver, ginjal, mata, lensa, jantung, organ kelamin.)
Minggu 9-36	- perkembangan organ-organ dan fetus
Minggu 36-40	- lahir

(Zeus, 1998; Bamea, 2000).

Tabel 2.4.4. Perbandingan perkembangan embrio mencit dan manusia pasca konsepsi

Tahap yang terjadi dalam proses kehamilan	Umur kehamilan	
	Mencit	Manusia
- fertilisasi	Hari 0.5 - 1	Hari 0.5 - 1
- pra-implantasi	Hari 2 - 5	Hari 2 - 5
- implantasi	Hari 6 - 6.5	Hari 6 - 7
- prasantogenesis	Hari 6 - 9	Hari 8 - 18
- embriogenesis	Hari 8 - 10	Minggu 3 - 8
- transisi	Hari 10 - 18	Minggu 9 - 35
trimester -3	Hari 19 - 21	Minggu 36 - 40

(Rugh, 1970; Cross, 1994; Zeus, 1998; Bamea, 2000)

Tabel 2.4.2., 2.4.3 dan 2.4.4. menunjukkan beberapa data perbandingan antara kebuntingan pada mencit dan kehamilan pada manusia. Dari ke-3 Tabel di atas dapat dilihat bahwa tahap perkembangan embrio mencit sejak fertilisasi, dilanjutkan dengan konsepsi sampai dengan tahap implantasi, pada dasarnya sama dengan tahap perkembangan embrio manusia. Perbedaan kecepatan pertumbuhan embrio yang sangat mencolok terjadi setelah tahap implantasi, yaitu setelah hari ke 6.5 pasca konsepsi. Jadi, perkembangan fetus setelah implantasi dan terbentuknya plasenta dapat menirukan kehamilan pada manusia yang dapat dibagi menjadi 3 trimester (Rugh, 1970; Cross *et al.*, 1994; Cunningham, 1997; Zeus, 1998, Barnea, 2000.).

2.4.2. Metoda mengawinkan mencit

Pada dasarnya mencit dapat dikawinkan secara alami/natural atau melalui perkawinan buatan/artifisial. Untuk mengawinkan mencit secara alami, ada dua metoda yang sering digunakan, yaitu perkawinan monogami dan poligami (*harem*). Masing-masing metoda tersebut mempunyai kelebihan dan kekurangan, sehingga untuk menentukan pilihan metoda mana yang akan dipakai perlu dipertimbangkan berbagai faktor serta disesuaikan dengan keadaan dan kebutuhan (Daniel, 1978; Baile, 1999).

2.4.2.1. Perkawinan monogami

yaitu metoda perkawinan dengan mengumpulkan satu mencit betina dengan satu pejantan dalam satu kandang. Metoda ini mempunyai kelebihan yaitu dapat menghasilkan anak dalam jumlah yang lebih banyak untuk setiap betina dalam kurun waktu tertentu. Caranya adalah dengan memanfaatkan masa

post partum estrus, yaitu dalam waktu 12 jam pasca melahirkan. Keunggulan lain dari metoda ini adalah dapat dilakukan identifikasi terhadap induk dan anak-anak mencit dengan mudah dan akurat. Kelemahan metoda ini dibandingkan metoda poligami adalah jumlah pejantan yang diperlukan harus lebih banyak (O'Brien and Holmes, 1993; Baile, 1999).

2.4.2.2. Perkawinan poligami

yaitu mengumpulkan satu pejantan dengan beberapa mencit betina (biasanya 4-5 ekor) dalam satu kandang. Cara ini lebih efisien dan jumlah pejantan yang diperlukan lebih sedikit, akan tetapi identifikasi dan pencatatan lebih sulit untuk dilakukan. Untuk mengatasi hal itu maka mencit betina yang sudah bunting harus segera dipisahkan agar peneliti dapat mengidentifikasi mencit mana yang telah melahirkan anak-anaknya. Induk mencit dikembalikan ke kandang pejantan setelah anak-anaknya disapih. Cara ini memerlukan jumlah pejantan yang lebih sedikit, tetapi memerlukan pemeliharaan yang lebih intensif untuk kelompok mencit tersebut (O'Brien and Holmes, 1993; Baile, 1999).

2.4.2.3. Saat dan prediksi keberhasilan perkawinan mencit

Untuk tujuan penelitian tertentu mungkin diperlukan saat perkawinan yang telah ditentukan (*timed mating*). Dalam hal ini pada umumnya mencit jantan dan betina dikumpulkan dalam satu kandang baik secara berpasangan atau dalam kelompok selama satu malam. Dengan cara ini pada umumnya mencit segera kawin. Hal ini dapat dibuktikan dengan memeriksa keberadaan '*vaginal plug*' pada keesokan harinya sebagai petanda bahwa telah terjadi kopulasi, dan ini disebut dengan *D-1 post mating* (H = 1 p.m.) (Voipio, 1998; Chung, 1999). Perkawinan juga

dapat dilakukan dengan mengumpulkan mereka terus menerus, kemudian setiap pagi selama 5 hari berturut-turut sang betina diperiksa adanya *vaginal plug*, dan dibiarkan bersama dengan pasangannya sampai hari berikutnya. Prediksi keberhasilan kebuntingan dengan cara ini bervariasi menurut galur mencit yang bersangkutan dan waktu mereka dikandangkan (Daniel, 1978, Voipio and Nevalainen, 1998, Barde, 2000, Eide, 2003). Mencit galur Balb/c yang dikandangkan secara berpasangan selama 5 hari, 80% sudah kawin pada malam pertama, dan rata-rata hanya 5% pada 4 hari berikutnya. Bila dikandangkan dalam kelompok dengan perbandingan 1:4, perkawinan yang terjadi pada malam pertama, kedua, ketiga dan keempat masing-masing adalah 40%, 30%, 15% dan 5%, sedang 10% sisanya tidak kawin. Dibandingkan dengan galur lain yaitu C57BL/10Wt, bila dikandangkan secara berpasangan ternyata perkawinan hanya terjadi 38%, 8%, 25% dan 8% masing-masing pada malam pertama, kedua, ketiga dan keempat, sedang sisanya sekitar 20% tidak kawin. Untuk perkawinan dalam kelompok, keberhasilan perkawinan hanya 38%, 20%, 28% dan 8%, dan sisanya sekitar 5% tidak kawin (Daniel, 1978).

2.4.3. Meningkatkan angka keberhasilan kebuntingan

2.4.3.1. Sinkronisasi estrus

Siklus birahi dapat dipengaruhi oleh siklus pergantian terang dan gelap (siang dan malam), dan ovulasi biasanya terjadi 3-6 jam setelah cuaca gelap. Pejantan akan mengawini betina yang sedang dalam keadaan birahi kira-kira pada pertengahan cuaca gelap. Perkawinan secara alami dapat menghasilkan angka keberhasilan yang cukup tinggi dengan cara pemilih mencit-mencit dari kelompoknya kemudian mengandangkan hanya mereka yang berada dalam fase

pro-estrus secara berpasangan pada sore hari. Penentuan tahap dalam siklus birahi ini dapat dilakukan melalui dua cara. Yang pertama adalah dengan mengamati keadaan mulut vagina secara makroskopik atau menggunakan kaca pembesar (*loupe*). Hal-hal yang diamati antara lain meliputi warna, kelembaban, mulut vagina membuka atau menutup dan adanya lipatan atau pembengkakan mukosa bibir vagina. Yang kedua adalah secara mikroskopik dengan mengambil nausan mulut vagina kemudian memeriksa bentuk sel-sel epitel vagina secara langsung (*direct smear*) di bawah mikroskop. Menghapus mulut vagina sebaiknya tidak dilakukan secara beruang karena dapat menyebabkan penebaran (*cornification*) mukosa dan hilangnya sel-sel, padahal tidak adanya sel-sel pada apusan mulut vagina merupakan ciri yang khas untuk fase *di-estrus*. (Daniel, 1978; Anonymous, 2003a). Kedua metoda tersebut mempunyai keunggulan dapat memperoleh angka kebuntingan (*pregnancy rate*) yang tinggi, karena kopulasi terjadi tepat pada saat ovulasi. Tetapi mengingat siklus birahi mencit yang tidak simultan maka untuk memperoleh sejumlah mencit yang bunting secara bersamaan diperlukan persediaan hewan yang lebih banyak. Cara lain adalah membuat mencit-mencit tersebut berada dalam kondisi oestrus secara bersamaan, dengan salah satu dari berbagai metoda sinkronisasi berikut

2.4.3.2. Sinkronisasi oestrus secara hormonal

Obat-obatan untuk merangsang ovulasi telah banyak digunakan untuk merangsang ovulasi dan meningkatkan jumlah sel telur yang dikeluarkan pada saat ovulasi. Metoda ini pada umumnya digunakan di bidang peternakan, seperti inseminasi buatan yang biasa dilakukan pada sapi. Dalam hal ini mencit betina diinjeksi dengan PMSC (*Pregnant Mare s Serum Gonadotropin*) sebanyak 5 i.U

secara intraperitoneal. Setelah 46-48 jam kemudian, mereka diinjeksi dengan HCG (*Human Chorionic Gonadotropin*) 5 IU, lalu dikawinkan dengan pejantan, dan pada keesokan harinya diperiksa adanya *vaginal plug* sebagai bukti bahwa telah terjadi perkawinan (Baile, 1999; Anonymous, 2003a)

2.4.3.3. Sinkronisasi oestrus dengan memanfaatkan pengaruh *pheromone*

Cara ini lebih alami dibanding cara yang hormonal. Mencit-mencit yang dikelompokkan sesama betina dalam kurun waktu lama cenderung untuk tidak mengikuti siklus birahi (*anestrus*), terhenti pada fase *di-estrus*, atau mengalami kebuntingan palsu (*pseudopregnancy*). Keadaan ini disebut *Lee-Boot effect*. Mencit betina yang telah dipisahkan dari pejantan baik secara individual ataupun berkelompok tersebut akan memulai siklus birahi yang sebelumnya terhenti bila dipapar dengan bau-bauan yang berasal dari pejantan, misalnya urine (*pheromone effect*). Dengan cara ini biasanya mencit betina akan mengalami birahi pada malam ke tiga setelah pemaparan. Fenomena ini disebut *Whitten effect*, dan ternyata cukup efektif bila dimanfaatkan untuk mendapatkan mencit betina dalam jumlah yang relatif banyak dan berada pada kondisi oestrus pada saat yang bersamaan. Perkawinan secara simultan dan kelompok mencit yang sedang dalam kondisi oestrus, akan menghasilkan angka kebuntingan yang cukup baik. Kebuntingan dapat terhenti bila pada tahap pre-implantas dipapar dengan mencit jantan asing. Bila kebuntingan terhenti oleh pengaruh paparan mencit jantan yang baru, maka selanjutnya akan diikuti oleh siklus birahi yang baru setelah 4-5 hari kemudian. Fenomena ini disebut *Bruce effect* (O'Brien and Holmes 1993; Baile, 2000; Anonymous, 2003a)

2.4.3.4. Hal-hal lain yang mempengaruhi kesuburan mencit

Secara teoritik memang mencit mempunyai daya reproduksi yang cukup tinggi, namun kenyataannya tingkat kesuburan mencit sangat dipengaruhi oleh cara-cara pemeliharaan dan faktor lingkungan. Kondisi kandang, suhu, ventilasi yang cukup dan komposisi makanan juga ikut berperan terhadap tingkat kesuburan. Komposisi makanan yang ideal dapat dilihat pada Tabel 2.4.3. Pada umumnya makanan mencit yang berupa pellet dapat dibuat sendiri dari bahan-bahan yang tersedia sehari-hari seperti jagung, dedak, tepung ikan, bungkil kedelai, bungkil kelapa, tepung daging dan tulang, pecahan gandum, bungkil kacang tanah, tepung daun, canola, vitamin, calcium, fosfat, dan trace mineral. Namun saat ini telah banyak dijumpai makanan ternak yang mudah dibeli di pasaran, dengan komposisi bahan terkandung yang sudah tertentu. Sebagai contoh Pellet jenis BR 1-B yang biasanya diberikan untuk anak ayam berumur 1-21 hari mempunyai komposisi yang cukup memenuhi syarat yang dibutuhkan untuk pemeliharaan mencit (Tabel 2.4.3).

Tabel 2.4.5. Komposisi kebutuhan makanan dan kandungan dalam pellet

Bahan makanan	Kebutuhan normal*)	Kandungan pellet BR 1-B**)
Karbohidrat	45 - 55%	Tidak disebutkan
Protein	20 - 25%	21.0 - 23.0%
Lemak	10 - 12%	Min 5.0%
Serat	Max 4%	Max 5.0%
Abu	5 - 6%	Max 7.0%
Calcium	1.0 - 1.5%	Min 0.90%
Phosphor	0.5 - 1.0%	Min 0.60%

*Smith and Mangkoewidjojo, 1987 ; **PTCharoen Pokphand Indonesia

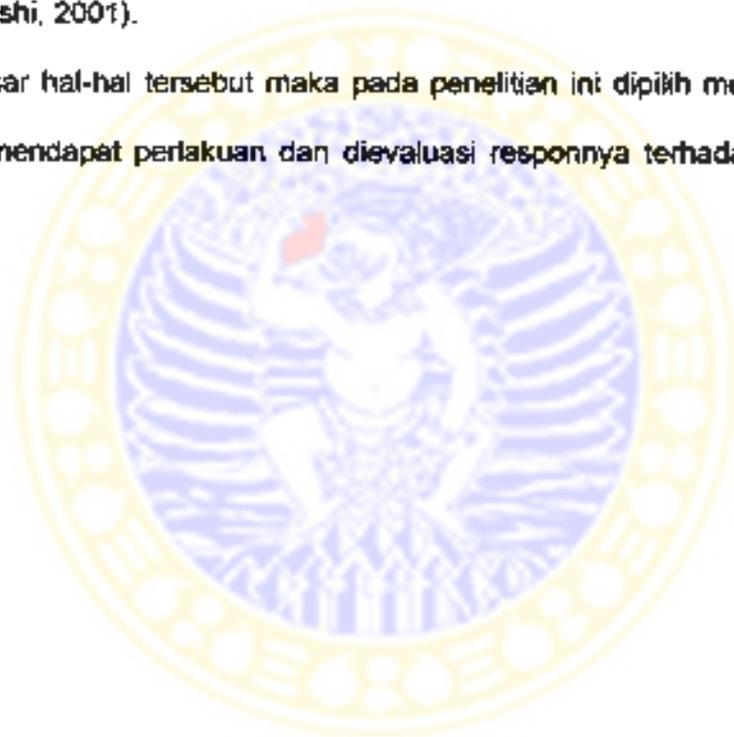
2.4.4. Penggunaan mencit dalam penelitian toksoplasmosis

Di Indonesia, angka kejadian penyakit infeksi pada manusia masih menduduki urutan tertinggi dibandingkan penyakit-penyakit yang lain. Berbagai jenis penyakit infeksi yang disebabkan oleh bakteri, virus, jamur dan parasit, menyebabkan angka kesakitan dan kematian yang masih tinggi. Selama lebih dari dua puluh tahun terakhir ini, toksoplasmosis pada manusia, khususnya pada kelompok ibu hamil, menjadi topik kajian yang menarik di kalangan para peneliti. Berbagai penelitian telah banyak dilakukan, baik melalui studi observasional maupun eksperimental dengan menggunakan berbagai jenis hewan coba, namun permasalahan yang lama belum dapat terpecahkan, justru muncul masalah yang baru. Dalam hubungannya dengan toksoplasmosis pada kehamilan, Roberts dan Alexander (1992) telah melakukan infeksi buatan pada mencit BALB/c dengan menginokulasi 5 kista *Toxoplasma gondii* secara oral pada 8 minggu sebelum kawin (grup 1), 20 kista pada hari ke-12 setelah kawin (grup 2), dan 5 kista pada 8 minggu sebelum kawin dan 20 kista pada hari ke-12 setelah kawin (grup 3). Hasilnya adalah pada grup 2 sekitar 50% anak mencit (*litters*) terinfeksi dan tak satupun dari *litters* dan grup 1 dan grup 3 yang terinfeksi. Hal ini menunjukkan bahwa transmisi *Toxoplasma gondii* secara vertikal hanya terjadi bila infeksi terjadi pertama kali pada awal kehamilan (Roberts and Alexander, 1992).

Banyak peneliti yang menggunakan mencit untuk mempelajari ciri dan sifat biologi *Toxoplasma gondii*, interaksi antara hospes dengan parasit termasuk uji patogenesis dan virulensi. Dikatakan bahwa mencit merupakan hewan coba yang mempunyai respon imunologis yang cukup baik, termasuk terhadap infeksi *Toxoplasma gondii*. (Roberts and Alexander, 1992; Guo and Johnson, 1996; Sibley and Howe, 1996; Dubey *et al.*, 1999). Selain itu banyak juga penulis yang

menyebutkan tentang penggunaan mencit untuk mempelajari perkembangan embrio dan gangguan kehamilan yang terjadi karena berbagai sebab, mulai pada tingkat seluler sampai dengan tingkat molekuler bahkan submolekuler. Selain itu mencit juga digunakan untuk percobaan dengan tujuan diagnostik, yaitu dengan metoda inokulasi parasit, serologik dan PCR. Berbagai publikasi terakhir telah menyebutkan penggunaan mencit sebagai model, khususnya tentang terjadinya proses apoptosis pada berbagai jenis sel akibat toksoplasmosis (Cross, 1994; Hunter, 1994a; Shiraishi, 1996; Henderson, 1998; Hirabayashi, 1999; Ejima, 2000; Takahashi, 2001).

Atas dasar hal-hal tersebut maka pada penelitian ini dipilih mencit sebagai model yang mendapat perlakuan dan dievaluasi responnya terhadap perlakuan tersebut.



BAB 3

KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1. Kerangka Konseptual Penelitian

3.1.1. Toksoplasmosis dan berbagai galur *Toxoplasma gondii*

Toksoplasmosis adalah penyakit zoonotik yang sering dihubungkan dengan kegagalan kehamilan, baik pada hewan ternak maupun pada manusia. Penyakit ini disebabkan oleh *Toxoplasma gondii*, parasit yang bersifat obligat intraseluler. Dikenal berbagai galur *Toxoplasma gondii*, yang berdasarkan tingkat virulensinya terbagi menjadi 3 golongan, yaitu type I yang mempunyai tingkat virulensi tinggi, type II yang tingkat virulensinya menengah dan type III yang tingkat virulensinya rendah atau non virulen. Lebih dari 70% kasus pada manusia berhubungan dengan galur dari tipe II. Galur tipe II ini juga lebih banyak ditemukan pada binatang yang dikonsumsi sehari-hari, seperti babi dan kambing (Zenner, 1993; Dupouy-Camet, 1997). Infeksi dengan galur tipe I (RH), sering dihubungkan dengan kejadian toksoplasmosis kongenital yang berat (Dardé, 1996; Sibley and Howe, 1996; Nischik, 2002).

Selain faktor genetik, faktor lingkungan, jenis hospes, dosis dan lama infeksi juga ikut berpengaruh terhadap virulensi dan derajat gangguan patologis yang timbul akibat infeksi *Toxoplasma*. Infeksi oleh galur type II pada mencit dengan dosis antara 10^2 - $>10^5$ menyebabkan kematian dalam waktu 10 sampai 20 hari. Inokulasi dengan galur RH kepada mencit menyebabkan kematian dalam waktu yang relatif singkat, yaitu 17-21 hari bila inokulan berasal dari pasase pertama, 7-8 hari bila dari pasase ke dua dan 3-5 hari bila dari pasase ke tiga dan selebihnya (Evans, 1992; Sibley and Howe, 1996).

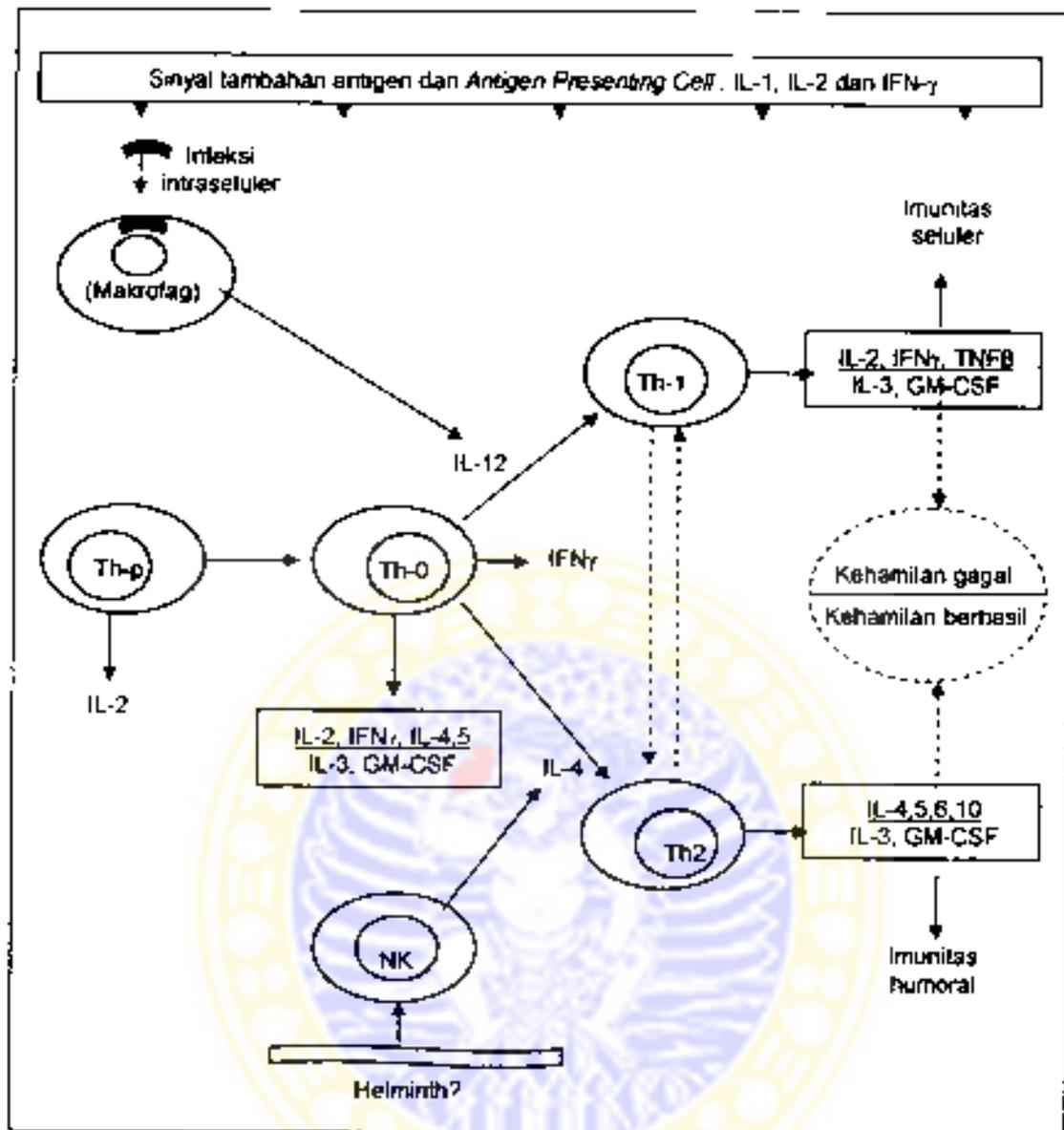
3.1.2. Peningkatan kadar IFN γ pada infeksi *Toxoplasma*

Setelah infeksi primer dengan *Toxoplasma gondii*, pada prinsipnya akan terjadi tiga tahap penting, yaitu tahap parasitemia, pembentukan antibodi dan dilanjutkan dengan tahap khronis. Pada individu yang normal, parasit yang beredar di dalam aliran darah (parasitemia) dan memasuki berbagai sel hospes akan merangsang sistem kekebalan tubuh, yaitu sistem kekebalan non spesifik, yang disusul oleh respon sistem kekebalan spesifik. Seperti patogen intraseluler yang lain, infeksi *Toxoplasma* memicu respon imun hospes terutama yang diperantarai oleh sel (*Cell Mediated Immune response= CMI*). Terjadinya peningkatan berbagai jenis sitokin pada hospes yang terinfeksi dengan *Toxoplasma gondii* (Denney, 1999; Mordue, 2001), menunjukkan bahwa produksi dan keseimbangan kadar berbagai sitokin berperan penting dalam mekanisme imunopatologi dan respon kekebalan yang berhubungan dengan toksoplasmosis (Mor and Abrahams, 2003). Makrofag merupakan bagian dari sistem kekebalan non spesifik yang terlibat langsung dalam respon kekebalan terhadap toksoplasmosis. Pada infeksi akut, makrofag berusaha memfagosit dan menghambat replikasi parasit. Makrofag yang teraktivasi memproduksi IL-12 yang memicu produksi sel Th1 dan melepas sitokin-sitokin tertentu seperti IL-2, TNF α dan IFN- γ (Kasper, 1998; Abbas, 2000, Baratawijaya, 2002). IFN- γ merupakan mediator utama dari sistem pertahanan tubuh (Suzuki *et al.*, 1988). Respon sitokin Th1 yang IFN- γ -dependent sangat penting dalam pengendalian infeksi terhadap toksoplasmosis terutama yang disebabkan oleh galur type II, tetapi produksi IFN γ yang berlebihan pada infeksi galur type I justru berdampak negatif terhadap hospes (Mordue, 2001).

3.1.3. Respon imun pada kehamilan normal dan yang mengalami infeksi

Keberhasilan dan kelangsungan kehamilan yang dimulai sejak sel sperma berhasil membuahi ovum sampai dengan kelahiran janin, pada hakekatnya didasari oleh mekanisme penerimaan konseptus (janin) oleh sistem kekebalan ibu yang bertaku sementara. Hal ini antara lain dipengaruhi oleh sifat antigenik janin yang belum sempurna, struktur anatomis antara janin dan ibu yang terpisah dan penurunan sistem kekebalan ibu selama kehamilan berlangsung (Medawar, 1953, Cross, 1994, Cunningham, 1997).

Teori imunotogik menyebutkan bahwa peran sitokin sangat penting dalam mekanisme penenmaan dan penolakan terhadap janin. Respon dan keseimbangan interaksi antara sitokin-sitokin dan sel T pro-inflamasi (Th-1), dengan sitokin-sitokin yang bersifat anti-inflamasi (Th-2), sangat menentukan keberhasilan dan kelangsungan kehamilan. Dalam keadaan normal respon Th-1 yang memproduksi sitokin-sitokin pro-inflamasi seperti TNF- α , IL-2 dan IFN- γ , diperlukan untuk mengawali proses implantasi, yaitu melalui invasi trofoblas dan menginduksi proses angiogenesis; tetapi segera setelah proses itu selesai, dominasi respon subset Th-1 seharusnya segera beralih ke respon Th-2. Keberadaan dan dominasi respon subset Th-2 seperti IL-4, IL-6 dan IL-10, diperlukan untuk memelihara kelangsungan kehamilan. Infeksi patogen intraseluler pada kehamilan menyebabkan hospes berada dalam posisi yang dilematis. Sitokin-sitokin Th-1 seperti IL-2, IFN- γ dan TNF- α yang diperlukan untuk melawan patogen ternyata bersifat embriotoksik dan berhubungan dengan *pre-term delivery* (Wegman, 1993; Hill, 1995; Yui, 1995; Ragupathy, 1997; Hilla, 1997; Beer and Kwak Kim, 1998; Coulam, 2000; Stemmer, 2000) (selanjutnya lihat Gambar 2.2.4 dan Gambar 3.1)



Gambar: 3.1. Bagan perkembangan subset sel T CD4, Th1 dan Th2 pada infeksi parasit intraseluler dan pengaruhnya pada kehamilan

Rangsangan sel T menimbulkan pelepasan berbagai sitokin oleh berbagai sel. Dalam kondisi berbeda, subset yang dibentuk dapat terjadi dalam dua subset yang berlawanan. Interleukin-12 (IL-12) yang diproduksi makrofag yang terinfeksi mikroba intraseluler memacu produksi sel Th1 yang melepas sitokin khas untuk respon kekebalan CMI. Interleukin-4 (IL-4) yang diduga diproduksi karena adanya interaksi antara mikroorganisme dengan sel NK, menimbulkan *switching* respons profil sel Th2 yang memproduksi sitokin yang berperan pada imunitas humoral. Sitokin yang diproduksi sel Th1 dan sel Th2 bekerja saling berlawanan. Kehamilan melibatkan pergantian peran Th1-ke-Th2, dan keseimbangan antara Th1-Th2 menentukan kegagalan atau kelangsungan kehamilan. *Thp* = *T helper precursor*, *Tho* = sel *T helper* dini yang memproduksi berbagai sitokin. (Ragupathy, 1997; Abbas, 2000; Baratawidjaja, 2002; Mor and Abrahams, 2003)

3.1.4. Apoptosis dan hasil kehamilan

Apoptosis atau kematian sel yang terprogram (*programmed cell death*) merupakan mekanisme fisiologis yang amat diperlukan untuk memelihara kestabilan populasi sel dalam berbagai jenis jaringan. Apoptosis juga merupakan mekanisme perlindungan diri sendiri terhadap pertumbuhan sel yang berlebihan (Steller, 1995; Majno, 1995; Verma, 1999; Abbas, 2000).

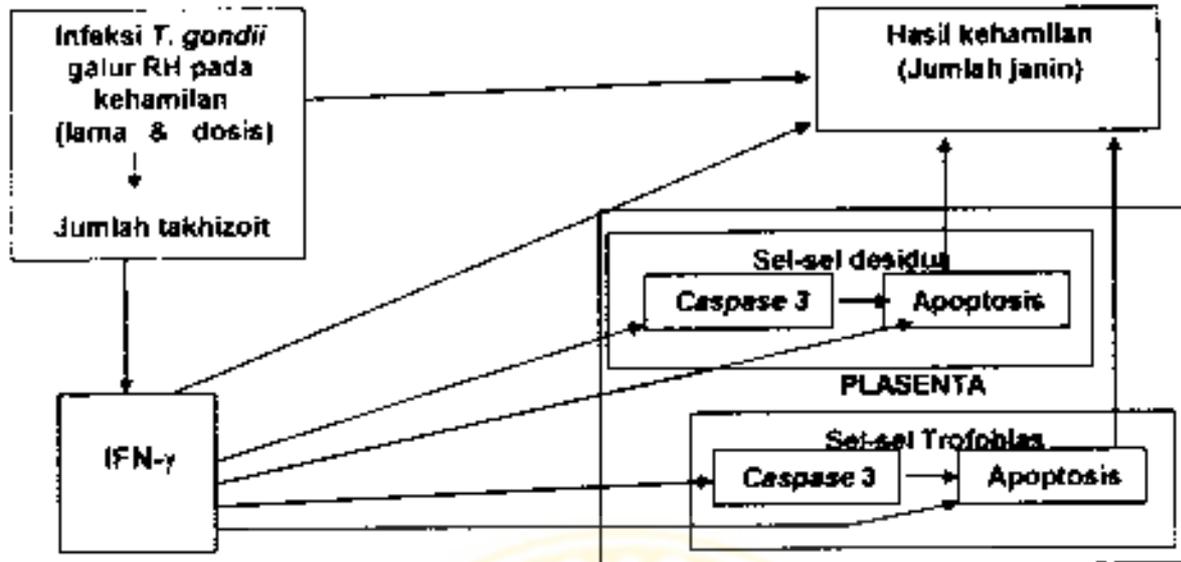
Dalam proses embriogenesis dan organogenesis yang normal, terjadi keseimbangan antara kecepatan proliferasi, diferensiasi dan apoptosis dari sel-sel yang sedang tumbuh (Cunningham, 1997; Cotran, 1999). Pada tahap implantasi, apoptosis diperlukan untuk menjamin *remodelling* jaringan desidua dan invasi janin yang sedang tumbuh. Telah terbukti bahwa selama kehamilan, sel-sel desidua dan trofoblas mengalami apoptosis yang berlangsung terus serta cenderung meningkat seiring dengan usia kehamilan (Runic, 1998; Jerzak, 1998; Kokawa, 1998; Jerzak, 1999; Ejima, 2000; Halperin, 2000; Qumsiyeh, 2000). Indeks apoptosis sel-sel plasenta pada kehamilan trimester 3 lebih tinggi dibandingkan pada trimester 1 dan 2 (Smith, 1997; Runic, 1998; Halperin, 2000). Indeks apoptosis sel-sel plasenta bayi alam yang lahir spontan tidak berbeda dengan plasenta bayi yang lahir melalui tindakan pembedahan caesar (Thiet *et al.*, 2000). Indeks apoptosis pada sel-sel plasenta ditemukan lebih tinggi secara bermakna pada kasus-kasus abortus, preeklamsi dan *IUGR*, dibanding pada kelahiran normal (Smith, 1997; Kokawa, 1998; Hirabayashi, 1999; Qumsiyeh, 2000; Mor and Abrahams, 2003). Dari pernyataan-pernyataan tersebut maka patut diduga bahwa peningkatan apoptosis sel-sel desidua dan trofoblast dapat menyebabkan terlepasnya buah kehamilan lebih awal dan program normal, dengan manifestasi abortus, kelahiran prematur, *IUGR*, lahir mati atau cacat.

3.1.5. Peningkatan kadar IFN γ , ekspresi enzim caspase-3 dan apoptosis

Pada kondisi normal, apoptosis diinduksi atau dihambat oleh sinyal-sinyal eksternal melalui interaksi antar sel dan oleh mekanisme biologik intraseluler. (Gambar 2.3.3 dan 2.3.4.) Infeksi akut yang menyebabkan meningkatnya kadar berbagai sitokin yang bersifat pro-inflamasi termasuk IFN- γ , memicu terjadinya apoptosis melalui jalur ekstrinsik, yang melibatkan empat kelompok molekul, yaitu *ligand*, *death receptors*, *adaptor proteins* dan sekelompok enzim protease cistein yang disebut *Caspases*. Ke-empat molekul tersebut seluruhnya membentuk *death inducing signaling complex* yang mengaktifasi *effector caspases* (*caspase 3*, *6* dan *7*) (Budiharjo, 1999, Anonymous, 2003b; Rowe and Chuang, 2004)

Caspase 3 merupakan *caspase* efektor utama yang teraktivasi selama hampir seluruh proses apoptosis. Penampilan atau ekspresi bentuk aktif dari *caspase 3* di dalam sel terjadi pada awal proses apoptosis, dan telah dapat dideteksi sebelum terjadinya perubahan morfologi dari sel tersebut. Peningkatan ekspresi enzim *caspase-3* di dalam sel tersebut telah dapat dideteksi melalui pemeriksaan imunohistokimia, dapat dijadikan dasar untuk mendeteksi sel-sel yang mengalami apoptosis (Pizem and Cor, 2003, Sanchez-Torres, 2003).

Dan uraian yang tersebut di atas, maka dapat dibuat kerangka konseptual penelitian seperti yang digambarkan pada Gambar 3.2 berikut ini



Gambar 3.2. Kerangka konsep penelitian Pengaruh infeksi *Toxoplasma gondii* galur RH pada mencit BALB/c terhadap hasil kehamilan melalui IFN γ , aktivitas caspase-3 dan apoptosis sel-sel plasenta

Keterangan:

- Infeksi *Toxoplasma gondii* mengandung parameter lama dan dosis infeksi yang berhubungan dengan jumlah takhizoit dalam cairan peritoneum.
 - Hasil kehamilan menggunakan parameter jumlah janin pada mencit BALB/c bunting yang dihitung pada saat pembedahan
 - IFN γ menggunakan parameter kadar IFN γ dalam plasma (ng/ml), diukur dengan teknik ELISA
 - Caspase 3 menggunakan parameter jumlah sel-sel trofoblas dan desidua yang mengekspresikan warna khromogen dihitung pada sedaan jaringan yang diwarnai secara imunohistokimia menggunakan antibodi anti-rabbit caspase-3.
 - Apoptosis sel-sel plasenta menggunakan parameter jumlah sel-sel trofoblas dan desidua yang apoptotik dihitung melalui pemeriksaan makroskopis sediaan dengan pewarnaan HE dan Apoptag
- Tanda panah menunjukkan hubungan yang akan diuji pada penelitian ini

3.2. Hipotesis Penelitian

Berdasarkan kerangka konsep dan tujuan yang ingin dicapai melalui penelitian ini, maka disusun hipotesis sebagai berikut.

Infeksi *Toxoplasma gondii* galur RH pada mencit BALB/c bunting menurunkan jumlah janin melalui peningkatan kadar IFN- γ , aktivitas caspase-3 dan apoptosis sel-sel plasenta.

Pembuktian hipotesis tersebut di atas dilakukan melalui pengujian beberapa sub hipotesis yaitu:

- 3.2.1. Dosis dan lama infeksi *Toxoplasma gondii* galur RH pada mencit BALB/c bunting, meningkatkan jumlah takhizoit di rongga peritoneum dan kadar IFN- γ plasma, serta menurunkan jumlah janin.
- 3.2.2. Peningkatan jumlah takhizoit *Toxoplasma gondii* galur RH di rongga peritoneum mencit BALB/c bunting meningkatkan kadar IFN- γ plasma dan menurunkan jumlah janin.
- 3.2.3. Peningkatan kadar IFN- γ plasma mencit BALB/c bunting meningkatkan aktivitas caspase-3 dan jumlah sel desidua dan trofoblas yang apoptosis, serta menurunkan jumlah janin.
- 3.2.4. Peningkatan aktivitas caspase-3 pada sel-sel desidua dan trofoblas mencit BALB/c meningkatkan jumlah masing-masing sel yang apoptosis.
- 3.2.5. Peningkatan jumlah sel desidua dan trofoblas yang apoptosis menurunkan jumlah janin.

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1. Jenis Penelitian

Penelitian eksperimental laboratorium ini dilakukan dengan menggunakan hewan coba mencit bunting yang diinfeksi tachizoit *Toxoplasma gondii* secara intraperitoneal. Pada penelitian ini yang dipilih sebagai hewan coba adalah mencit oleh karena dalam bidang embriologi ia cukup memenuhi persyaratan ideal sebagai hewan coba, terutama dalam hal kekerabatannya dengan manusia, khususnya jenis plasentanya. Selain itu mencit mudah diperoleh, harganya relatif murah, cara pemeliharannya mudah dan daya tahan fisik serta kemampuan reproduksinya cukup tinggi (Rugh, 1970; Smith and Mangkoewidjojo, 1987; Cross, 1984; Cunningham, 1997; Penn, 1999).

4.1.1. Rancangan/Desain Penelitian

Pemilihan hewan coba untuk pemberian perlakuan dan memasukkannya ke dalam kelompok, menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) atau *Completely Randomized Design* (CRD), mengingat hewan coba dan bahan penelitian diusahakan homogen. Dengan rancangan ini dimungkinkan setiap hewan coba berpeluang sama untuk mendapatkan perlakuan dan masuk ke dalam kelompok tertentu (Gambar 4.1)

4.1.2. Jumlah Replikasi

Tujuan dan penelitian ini adalah untuk mengukur pengaruh dosis parasit yang digunakan untuk menginfeksi mencit dan lama berlangsungnya infeksi terhadap peningkatan kadar sitokin IFN- γ plasma, pengaruhnya terhadap

peningkatan ekspresi enzim caspase-3 dan apoptosis sel-sel desidua maupun trofoblas. Dengan demikian maka jumlah ulangan dapat dihitung berdasarkan tingkat ketelitian data, dengan mempertimbangkan kestabilan ragam galat. Untuk mencapai tujuan tersebut analisis data dapat dilakukan dengan F-tes, melalui ANOVA. Dengan analisis ini perhitungan jumlah ulangan dapat ditentukan dengan merujuk kepada derajat bebas galat (db-galat) atau *degrees of freedom error* (*df-error*), yaitu data cukup teliti bilamana ragam galat stabil, dan akan tercapai bilamana $db\text{-galat} > 15$ (Musa dan Nasution, 1989).

Tabel 4.1 ANOVA RAL (Rancang Acak Lengkap)

Sumber keragaman (Source of variance)	db (= derajat bebas) (df = degrees of freedom)
Pelakuan	$p - 1$
Galat	$(np - 1) - (p - 1)$
Total	$np - 1$

$$\begin{aligned} \text{Derajat bebas galat : } db_{\text{galat}} &= (np - 1) - (p - 1) \\ &= np - p \\ &= p(n - 1) \end{aligned}$$

Penentuan jumlah ulangan, dengan rumus : $db_{\text{galat}} \geq 15$. Dengan rumus ini, ragam galat (*error*) cukup stabil dan jumlah ulangan yang diperoleh dapat menjamin ketelitian (*presisi*) data (Musa dan Nasution, 1989).

Pada penelitian ini terdapat 3 tingkat dosis inokulasi, yaitu dosis 1, dosis 2 dan dosis 3, ditambah kelompok kontrol yang tidak diinokulasi; sedangkan waktu pembedahan adalah sebanyak 4 kali. Dengan demikian maka seluruh perlakuan yang ingin diketahui responnya adalah $4 \times 4 = 16$ perlakuan.

Untuk perlakuan sebanyak 16, maka $p = 16$

$$d_{\text{bgalat}} \geq 15$$

$$16(n - 1) \geq 15$$

$$n - 1 \geq 15/16$$

$$n - 1 \geq 0.95$$

$$n \geq 1.95 \cong 2$$

Jadi untuk RAL dengan perlakuan sebanyak 16, agar diperoleh data yang teliti maka diperlukan ulangan untuk masing masing perlakuan minimal 2 kali, sehingga diperlukan paling sedikit : 2×16 ekor = 32 ekor mencit bunting.

Untuk memperoleh sejumlah mencit bunting secara bersamaan, maka ditakukan metoda sinkronisasi oestrus dengan memanfaatkan beberapa fenomena alam, yaitu *Lee-Boot effect*, *Whitten effect* dan *Pheromone effect* (O'Brien and Holmes, 1993; Bailie, 2000; Anonymous., 2003b). Untuk menjamin keberhasilan kebuntingan, dipilih hewan yang sudah terbukti subur, yaitu mencit yang sudah pernah beranak. Menurut Eide (2003) mencit dari galur Balb/c mempunyai tingkat kesuburan sekitar 47%. Dengan demikian bila diperlukan minimal sebanyak 32 ekor mencit dengan usia kebuntingan yang sama, maka dengan perhitungan *pregnancy rate* sebesar 40-50%, jumlah hewan coba yang harus dipersiapkan adalah berjumlah :

$$100\%: 40\% \times 32 \text{ ekor} = 80 \text{ ekor mencit}$$

Agar semua variabel yang akan diperiksa terpantau dengan baik, maka setiap mencit diberi kode sesuai dengan dosis yang diberikan, rencana hari pembedahan dan nomor mencit dalam kandang masing-masing (Lampiran 1). Perlakuan dan variabel yang diukur diuraikan pada Tabel 4.2. dan Gambar 4.1.

Tabel 4.2 Rincian perlakuan, waktu pembedahan dan variabel yang diukur

Pertakuan Inokulasi Toxo i.p. (hari ke-7-9)	Kljk	Dibedah	Variabel yang diukur
Kontrol Dilinjeksi PBS (20 mencit)	A-P	Hari 12	Jumlah janin, Takhizoit, IFN- γ , caspase-3, indeks apoptosis
	A-Q	Hari 14	Jumlah janin, Takhizoit, IFN- γ , caspase-3, indeks apoptosis
	A-R	Hari 16	Jumlah janin, Takhizoit, IFN- γ , caspase-3, indeks apoptosis
	A-S	Hari 18	Jumlah janin, Takhizoit, IFN- γ , caspase-3, indeks apoptosis
Dosis 1 10 lakhizoit (20 mencit)	B-P	Hari 12	Jumlah janin, Takhizoit, IFN- γ , caspase-3, indeks apoptosis
	B-Q	Hari 14	Jumlah janin, Takhizoit, IFN- γ , caspase-3, indeks apoptosis
	B-R	Hari 16	Jumlah janin, Takhizoit, IFN- γ , caspase-3, indeks apoptosis
	B-S	Hari 18	Jumlah janin, Takhizoit, IFN- γ , caspase-3, indeks apoptosis
Dosis 2 50 lakhizoit (20 mencit)	C-P	Hari 12	Jumlah janin, Takhizoit, IFN- γ , caspase-3, indeks apoptosis
	C-Q	Hari 14	Jumlah janin, Takhizoit, IFN- γ , caspase-3, indeks apoptosis
	C-R	Hari 16	Jumlah janin, Takhizoit, IFN- γ , caspase-3, indeks apoptosis
	C-S	Hari 18	Jumlah janin, Takhizoit, IFN- γ , caspase-3, indeks apoptosis
Dosis 3 100 lakhizoit (20 mencit)	D-P	Hari 12	Jumlah janin, Takhizoit, IFN- γ , caspase-3, indeks apoptosis
	D-Q	Hari 14	Jumlah janin, Takhizoit, IFN- γ , caspase-3, indeks apoptosis
	D-R	Hari 16	Jumlah janin, Takhizoit, IFN- γ , caspase-3, indeks apoptosis
	D-S	Hari 18	Jumlah janin, Takhizoit, IFN- γ , caspase-3, indeks apoptosis

4.1.3. Identifikasi Variabel

4.1.3.1. Variabel bebas :

- jumlah takhizoit *Toxoplasma gondii* yang diinokulasikan
- umur kehamilan dan lama infeksi pada saat pembedahan

4.1.3.2. Variabel antara :

- jumlah takhizoit dalam cavum peritoneum pada hari pembedahan

4.1.3.3. Variabel tergantung :

- Jumlah janin
- Kadar sitokin IFN- γ dalam darah
- Indeks apoptosis sel-sel desidua dan trofoblas

4.2. Definisi Operasional

- 4.2.1. Hewan coba adalah mencit BALB/c betina yang baru melahirkan anak. Mencit-mencit tersebut sejak bunting (gravida 1 atau 2) telah dipisahkan di dalam kandang tersendiri yang masing-masing berisi 5 mencit, dan tetap dibiarkan berada dalam kandang sampai anak-anaknya lahir dan berusia satu minggu yaitu kurang lebih 3 minggu (Smith and Mangkoewidjono, 1987)
- 4.2.2. Perkawinan mencit adalah perlakuan terhadap mencit yang telah diuraikan dalam 4.2.1 dengan mengumpulkannya dalam kandang dengan pejantan yang femil dengan ratio 1 : 1 selama satu malam, sesuai dengan prosedur pada lampiran 4 (O'Brien and Holmes, 1993; Baihe, 1999)
- 4.2.3. Kebuntingan mencit ditentukan dengan kriteria adanya vaginal plug sebagai petanda telah terjadi kopulasi yang diamati pada keesokan harinya (-1), atau dengan pengamatan fisik berupa penambahan berat badan dan postur tubuh sepanjang waktu pengamatan. Mencit yang pada pengamatan fisik terlihat tidak bunting tidak ikut sertakan dalam analisis lebih lanjut tetapi diamati kematiannya untuk kelengkapan data yang lain. Kriteria kebuntingan dipastikan dengan ditemukannya sel-sel desidua pada pemeriksaan mikroskopis dan sediaan jaringan uterus (Daniel, 1978; Loke and King, 1995; Voipio and Nevalainen, 1998)
- 4.2.4. Infeksi *Toxoplasma gondii* pada mencit adalah infeksi buatan yang dilakukan kepada mencit BALB/c bunting dengan menginokulasi takhizoit dengan dosis yang telah ditetapkan, melalui injeksi secara intraperitoneal pada hari ke-5 pasca kawin toki (Smith and Mangkoewidjono, 1987)

- 4.2.5 Oosis takhizoit adalah jumlah takhizoit dari inasil panen pasase pertama dari satu mencit yang diinfeksi dengan isolat *Toxoplasma gondii* galur RH, kemudian dihitung dan dilarutkan dengan PBS sedemikian rupa sehingga diperoleh bahan inokulan yang masing-masing mengandung 10, 50 dan 100 takhizoit, untuk diinfeksi pada mencit yang telah disiapkan (Sardjono, 2003)
- 4.2.6 Angka keberhasilan kebuntingan (*pregnancy rate*) adalah jumlah mencit yang di antara seluruh mencit yang dikawinkan pada pengamatan secara fisik menjelang dan pada saat pembedahan berhasil bunting (O'Brien and Holmes, 1993, Penn, 1999)
- 4.2.7. Umur kebuntingan mencit adalah hari pada saat pembedahan mencit, yang dihitung sejak mencit-mencit dikandangkan dengan penjantan (H-0) (Smith and Mangkoewidjojo, 1987, O'Brien and Holmes, 1993; Barlie, 1999)
- 4.2.8 Kegagalan kebuntingan pada mencit adalah terhentinya pertumbuhan fetus, yang manifestasinya dapat berupa keluarnya hasil konsepsi sebelum umur kebuntingannya cukup (*preterm*), perdarahan per vaginam (*fluxus*) atau adanya regresi total atau sebagian, pertumbuhan infantil (*IUGR*), rusak bahkan sampai hilangnya bentuk fetus dan/atau plasenta pada kantong embrio yang bersangkutan (Smith and Mangkoewidjojo, 1987; Benirschke, 2002) Terhentinya kebuntingan dipastikan atas dasar pengamatan secara tersendiri pada saat atau setelah pembedahan dengan menggunakan loupe atau pengamatan sediaan uterus dengan mikroskop. Ditemukannya sel-sel desidua pada pemeriksaan histopatologi memastikan bahwa mencit tersebut pernah bunting dan kemudian gagal (Loke and King, 1995)

- 4.2.9. Hasil kehamilan adalah jumlah janin yang masih ada setelah perlakuan, dihitung menurut jumlah kantong embrio/lobus yang masih berisi janin dan/atau plasenta pada setiap mencit yang dibedah (Benirschke, 2002).
- 4.2.10. Kadar sitokin IFN- γ plasma, diukur dengan metoda ELISA (ng/ml), menggunakan *Kit Mouse IFN- γ ELISA BMS606* (Bender MedSystems, Medsystems Diagnostic GmbH, Austria) (Lampiran 5).
- 4.2.11. Aktivitas enzim caspase-3 diperoleh dari penghitungan sel-sel desidua dan trofoblas yang mengekspresikan caspase-3 aktif. Pada sediaan jaringan yang diwarnai secara imunohistokimia dengan menggunakan antibodi poliklonal anti *rabbit caspase-3* (Lampiran 6a) sitoplasma sel-sel tersebut mengekspresikan warna coklat (Pizem and Cor, 2003)
- 4.2.12. Sel-sel yang mengalami apoptosis adalah sel-sel desidua dan trofoblas dan sediaan jaringan plasenta mencit yang dengan pewarnaan HE, mengalami perubahan morfologis antara lain berupa 1) pengecilan ukuran sel, 2) organel tersusun lebih padat, 3) adanya agregasi khromatin di pinggir nukleus di bawah membran inti yang nampak sebagai masa yang tegas, 4) adanya bentukan-bentukan apoptotik dan 5) infiltrasi makrofag tanpa sel-sel radang netrofil (Cohen, 1993) Penghitungan sel-sel desidua dan trofoblas yang apoptotik dilakukan dengan pengamatan di bawah mikroskop pada daerah *feto-maternal junction* (Lampiran 7 dan 8)
- 4.2.13. Sel-sel yang mengalami apoptosis juga dihitung pada insang serial dari jaringan tersebut, yang pada pewarnaan khusus menggunakan *ApopTag@ Peroxidase in Situ Apoptosis Detection Kit* berwarna coklat (Intergen, 1998)

4.2.14. Indeks apoptosis yaitu jumlah sel yang mengalami apoptosis di antara 1000 sel-sel masing-masing populasi sel yang sejenis (yaitu trofoblas atau desidua). Untuk lebih menjamin kebenaran, jumlah sel dihitung dari 20 satuan lapangan pandang dengan pembesaran 1000 X, Diperkirakan dalam 20 lapangan pandang tersebut sudah mengandung lebih kurang 1000-1500 sel yang sejenis (Soini, 1998; Pizem and Cor, 2003).

4.3. Bahan penelitian

4.3.1. Hewan coba.

Delapan puluh ekor mencit betina galur *BALB/c*, yang berumur 4-6 bulan, sehat, dan baru melahirkan (Para 1 atau para 2), dengan berat badan sekitar 25-40 gram, yang diperoleh dari hasil biakan di Laboratorium Pusvetma Wonocolo Surabaya.

4.3.2 Bahan inokulan.

Takhizoit *Toxoplasma gondii* galur RH, diperoleh dari hasil panen yang dilakukan pada hari ke-4 dari inokulasi pertama pada mencit yang telah diinfeksi dengan stabilat *Toxoplasma gondii* galur RH yang disimpan di Laboratorium Bioteknologi Pusat Antar Universitas (PAU-Biotek UGM).
(Lampiran 3)

4.3.3. Bahan pemeriksaan yaitu:

4.3.3.1. Sampel darah : diambil dari sinus orbitalis dari tiap-tiap mencit sesaat sebelum dibedah, lalu dipisahkan dan diambil plasmanya, disimpan

pada suhu -40°C , menunggu sampel yang lain untuk pemeriksaan sitokin IFN- γ dengan metoda ELISA.

- 4.3.3.2. Seluruh bagian uterus cornu kiri dan kanan (*in toto*) dari tiap-tiap mencit untuk pemeriksaan dan penghitungan angka keberhasilan dan kegagalan kebuntingan.
- 4.3.3.3. Dua lobus uterus mencit bunting atau seluruh sisi cornu uterus kiri dan kanan yang telah difiksasi dalam blok parafin dan dibuat sediaan histologi untuk pemeriksaan histopatologi dan imunohistokimia.

4.3.4. Bahan-bahan kimia, yaitu :

- 4.3.4.1. Cat Hemetoksilin Eosin untuk pewamaan sediaan histopatologi
- 4.3.4.2. Kit Mouse IFN- γ ELISA BMS606 (Bender MedSystems, Medsystems Diagnostic GmbH, Austria)
- 4.3.4.3. ApopTag® Peroxidase in Situ Apoptosis Detection Kit (Intergen Company)
- 4.3.4.4. Kit pewamaan imunohistokimia dengan antibodi primer poliklonal anti-rabbit caspase-3 beserta substrat dan khromogennya.

4.4. Waktu, tempat, tahap-tahap dan prosedur penelitian

Waktu penelitian diperkirakan selama 6-18 bulan, terdiri dari tiga tahap dimulai sejak bulan Oktober 2002.

Tahap ke-1 yaitu persiapan, berupa pembiakan dan perkawinan mencit dilakukan di Laboratorium Pusvetma Wonocolo Surabaya.

Tahap ke-2 yaitu penyiapan inokulan, inokulasi, hitung takhizoit, pembedahan dan pemerksaan ELISA untuk sitokin dilakukan di Laboratorium Bioteknologi PAU Universitas Gajah Mada

Tahap ke-3 yaitu pengamatan terhadap keberhasilan dan kegagalan kebuntingan secara mikroskopis yaitu pembuatan sediaan histopatologi, pewarnaan imunohistokimia, pemeriksaan serta penghitungan sel-sel apoptosis (*apoptotic index*) dilakukan Laboratorium Patologi Anatomi dan Laboratorium Biomedik FK Unibraw Malang.

4.4.1. Tahap persiapan :

4.4.1.1. Pengadaan hewan coba

Sebanyak 80 ekor mencit betina galur BALB/c yang sehat, umur 4-6 bulan, berat badan sekitar 25 - 45 gram dan sedang bunting dipisahkan dan pejantan lalu dikelompokkan dalam kandang tersendiri dan diberi kode. Jumlah seluruhnya adalah 16 kandang, masing-masing berisi 5 ekor mencit sesama betina. Setiap mencit diamati sampai melahirkan, dicatat tanggal partus dan jumlah anak yang dilahirkan untuk menilai tingkat kesuburannya. Setelah lebih kurang 3 minggu, anak-anak mencit dipisahkan dan induknya (lampiran 4). Semua hal tersebut dilakukan untuk menghindari perkawinan segera setelah partus (*post partum oestrus*) (Baillie, 2000).

4.4.1.2. Sinkronisasi oestrus dan jadwal perkawinan (lihat lampiran 4)

Dengan pengelompokan sesama betina tanpa kehadiran pejantan, mencit-mencit akan tetap berada dalam kondisi anestius (*Lee-Boot Effect*). Sinkronisasi estrus dilakukan dengan membawa kandang yang berisi mencit betina ke dekat kandang yang berbau atau bekas terisi pejantan secara serentak. Diusahakan agar kandang tersebut tetap terpisah, sehingga walaupun sudah terjadi kontak bau *pheromones* dari urine pejantan (*olfactory contact*), tetapi mencit jantan tidak dapat mengawini betinanya. Mencit betina

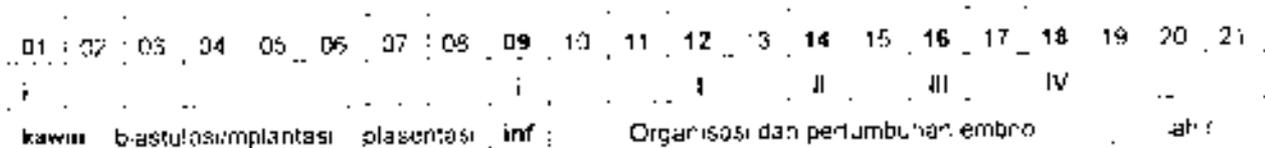
akan berada dalam kondisi oestrus pada malam ketiga setelah kontak *pheromones* (*Whitten effect*) (Baillie, 2000; Eide, 2003). Perkawinan dilakukan secara monogami, yaitu mencampur satu mencit betina dengan satu mencit jantan pada hari ketiga tersebut, mulai jam 14.00 siang, sampai pada jam 09.00 keesokan harinya pejantan diambil dan kandang (Baillie, 2000). Keberhasilan kebuntingan dinilai atas dasar ditemukannya vaginal plug pada keesokan harinya serta perubahan fisik yang nampak pada saat menjelang pembedahan. Mencit yang pada hari pembedahan ternyata tidak bunting tetapi telah diinfeksi tidak disertakan dalam analisis kelompok bunting, tetapi tetap diamati sampai akhir jadwal pengamatan (hari 18 pasca kawin) (Gambar 4.2)

4.4.2. Tahap inokulasi dan pembedahan mencit

Inokulasi dan pembedahan dilakukan dengan landasan teoritis dan perhitungan bahwa pada proses kebuntingan mencit

- a. Implantasi terjadi 4,5 - 5,5 hari setelah fertilisasi (Cross *et al.* 1994), sehingga proses plasentasi dan pertumbuhan embrio baru terjadi selanjutnya, yaitu hari ke-6 dan selanjutnya.
- b. Proses organisasi dan embrio mencit terjadi sejak hari ke 6,5 - 10,5. Hari ke 9,5 sudah mulai berkembang organ-organ derivat dan neural tube, yaitu otak dan mata (Cross *et al.* 1994). Dengan demikian inokulasi yang dilakukan pada H-9 pada mencit dapat menimbulkan infeksi pada kehamilan trimester pertama pada manusia.
- c. Pembedahan yang dilakukan pada hari ke 12 dan 14, serta hari ke 16 dan 18, masing-masing mewakili keadaan kehamilan pada trimester 2 dan 3 pada manusia.

Untuk mendapatkan hasil sesuai dengan yang diharapkan baik dari faktor keberhasilan kebuntingan, ketepatan waktu inokulasi selama kebuntingan mencit serta perhitungan bahwa mencit masih tetap hidup sampai hari akhir pengamatan, maka dibuat jadwal seperti yang tercantum pada Gambar 4.1.



Gambar 4.1. Skema /jadwal pertakuan terhadap hewan coba

- I : rencana pembedahan 1
- II : rencana pembedahan 2
- III : rencana pembedahan 3
- IV : rencana pembedahan 4

4.4.3. Penyediaan inokulan takhizoit *Toxoplasma gondii*

- 4.4.3.1. Diambil satu appendorf yang berisi stok Isolat/Stabilat *Toxoplasma gondii* dan tempat penyimpanan dalam tabung N_2 cair. Setiap appendorf stabilat yang mengandung 3×10^7 takhizoit, dibagi menjadi 3 dosis, kemudian disuntikkan secara intraperitoneal kepada 3 ekor mencit yang sudah disiapkan tersendiri, masing-masing dengan dosis 10^7 takhizoit.
- 4.4.3.2. Pertumbuhan takhizoit di dalam tubuh mencit diamati setiap hari selama 4-6 hari atau sampai mencit nampak sakit, ditandai dengan anoreksia, mobilitas berkurang, lemah, bulu-bulu berdiri dan kusam.
- 4.4.3.3. Bila mencit sudah nampak sakit, sebelum mati akibat infeksi, mencit dimatikan dengan cara dislokasi cervical, takhizoit dipanen dengan cara mencuci rongga peritoneum dengan 6-8 cc larutan garam fisiologis steril, lalu diaspirasi sampai habis. Cairan aspirat yang diperoleh diencerkan 100 kali, lalu jumlah takhizoit dihitung di dalam ruang hitung.

Neubauer. Bila populasi takhizoit masih terlalu padat sehingga sulit dihitung, cairan aspirat diencerkan lagi sampai jumlah takhizoit dapat dihitung dengan baik. Panen dari hasil penanaman stabilat ini disebut panen pasase pertama

4.4.3.4 Bila hasil panen belum menghasilkan takhizoit dalam jumlah dan motilitas yang cukup optimal, maka aspirat diinjeksikan lagi pada mencit yang lain, kemudian diikuti perkembangannya seperti prosedur di atas. Hasil panen dari penanaman tersebut disebut pasase ke-2, 3 dan seterusnya

4.4.3.5 Aspirat hasil panen takhizoit dihitung konsentrasinya, kemudian dibuat inokulan dengan konsentrasi yang diinginkan, disiapkan dalam spuit 1 cc, lalu disuntikkan ke mencit yang sudah disiapkan sesuai dengan kode masing-masing

4.4.4. Tahap eksperimen/perlakuan

4.4.4.1. Inokulasi takhizoit dan pengamatan setelah infeksi

4.4.4.1.1 Berdasarkan hasil optimasi dosis yang telah dilakukan pada penelitian pendahuluan (Sardjono, 2003), maka dalam penelitian ini bahan inokulan yang akan diinfeksi kepada hewan coba adalah takhizoit yang berasal hasil panen pasase pertama (4.4.3.3.). Bahan inokulan yang sudah diarturkan dalam larutan PBS masing-masing mengandung 10, 50 dan 100 takhizoit (dosis 1, 2 dan dosis 3), disiapkan dalam spuit masing-masing sebanyak 0,5 cc untuk sejumlah mencit yang akan diinfeksi sesuai dengan kelompoknya.

4.4.4.1.2 Infeksi dilakukan secara intraperitoneal dengan menyuntikkan inokulan sesuai dengan dosis yang ditentukan tersebut kepada mencit

yang telah disiapkan, pada hari ke-9 setelah perkawinan (H-9 p.k). Mencit dari kelompok kontrol diinjeksi larutan PBS (plasebo) sebanyak 0.5 ml secara intraperitoneal. Mencit-mencit yang telah diinfeksi tersebut dikembalikan ke kandang masing-masing dan dilihat perkembangannya setiap hari sampai pada hari pembedahan.

4.4.5. Tahap pengamatan hasil perlakuan

4.4.5.1. Pengamatan perubahan fisik

Pengamatan terhadap perubahan keadaan fisik dan beral badan yang terjadi akibat perlakuan, dilakukan setiap 2 hari sejak mencit dikawinkan, sampai dengan jadwal pembedahan masing-masing, yaitu pada H.12, H14, H16 dan H18 pasca kawin (p.k). Pengamatan yang lebih lengkap meliputi berat badan, pengambilan darah untuk pemeriksaan sitokin IFN- γ di dalam plasma darah tepi dan penghitungan jumlah takhizoit di dalam cairan peritoneum, dilakukan bersamaan dengan jadwal pembedahan (Gambar 4.1)

4.4.5.2. Pengambilan sampel darah

Sebelum mencit dimatikan dan dibedah, sampel darah diambil dari sinus orbitalis sebanyak \pm 1 mililiter, (lihat Gambar 4.2). Darah dimasukkan ke dalam appendorf lalu dimasukkan kotak berisi es dan dibiarkan membeku. Selain itu juga dibuat sedaan apus di atas object glass kemudian dikeringkan, sambil menunggu waktu pewarnaan dengan Giemsa. Darah yang sudah membeku lalu diputar dengan sentrifus untuk diambil plasmanya, dan disimpan di almari es untuk pemeriksaan sitokin.

4.4.5.3. Pembedahan mencit.

Pembedahan dilakukan sesuai dengan hari yang telah dijadwalkan untuk masing-masing kelompok dosis (Gambar 4.1 dan 4.2.). Mencit yang telah diambil darahnya, dimatikan dengan cara dislokasi servikal, dan selesai dibedah, diambil uterus dan organ-organ lain yang mungkin diperlukan pada analisis lebih lanjut. Bangkai mencit yang telah diambil organ-2 tubuhnya dibungkus kantong plastik yang telah disediakan, disimpan dalam almari es sambil menunggu proses pembakaran pada akhir penelitian ini, sesuai dengan prosedur yang berlaku berkenaan dengan *biohazardness*.

4.4.5.4. Pemeriksaan kadar sitokin IFN- γ plasma

Pemeriksaan sitokin IFN- γ dilakukan di Laboratorium Biokimia PAU-Biotek UGM dengan metode ELISA. (lampiran 5)

4.4.5.4. Pemeriksaan organ dan jaringan

Untuk mendapatkan data yang dapat memberi informasi yang lengkap, maka seluruh organ uterus diambil secara utuh, kemudian dimasukkan ke dalam wadah berisi larutan formalin 10% yang telah disediakan, lalu dibawa ke Malang untuk dibuat sediaan histopatologi pada pemeriksaan lebih lanjut.

4.4.5.5. Penilaian hasil kebuntingan mencit

Penilaian hasil kebuntingan diperoleh dengan menghitung jumlah embrio atau bekas pelekatan janin yang masih ada di tiap-tiap cornu uterus. Hasil tersebut merupakan hasil akhir dari kebuntingan yang dapat diamati, termasuk akibat adanya kegagalan kebuntingan.

berupa fluxus pervaginam, kelahiran sebelum waktunya (*preterm labor*), pengecilan ukuran janin dan kantong embrio dibandingkan dengan sekitarnya (*IUGR*), atau uterus mengecil sama sekali sehingga menyerupai uterus tidak bunting (*resorpsi*).

4.4.5.6. Pembuatan sediaan jaringan

Insan jaringan uterus dilakukan sedemikian rupa sehingga mengenai bagian sisi maternal dan fetal (dinding uterus, jaringan plasenta yang meliputi desidua basalis dan trofoblasnya, dan bagian tubuh fetus). Dari insan yang serai, dibuat 3 sediaan masing-masing disiapkan untuk pewarnaan dengan hematoxilin eosin (HE), dan *ApopTag® Peroxidase in Situ Apoptosis Detection Kit*, dan pewarnaan secara imunohistokimia dengan antibodi *anti-rabbit caspase 3*. Prosedur pembuatan dan untuk masing-masing pewarnaan tercantum pada lampiran 6.

4.4.5.7. Pemeriksaan histopatologik untuk sel-sel apoptotik dan ekspresi enzim *caspase-3*

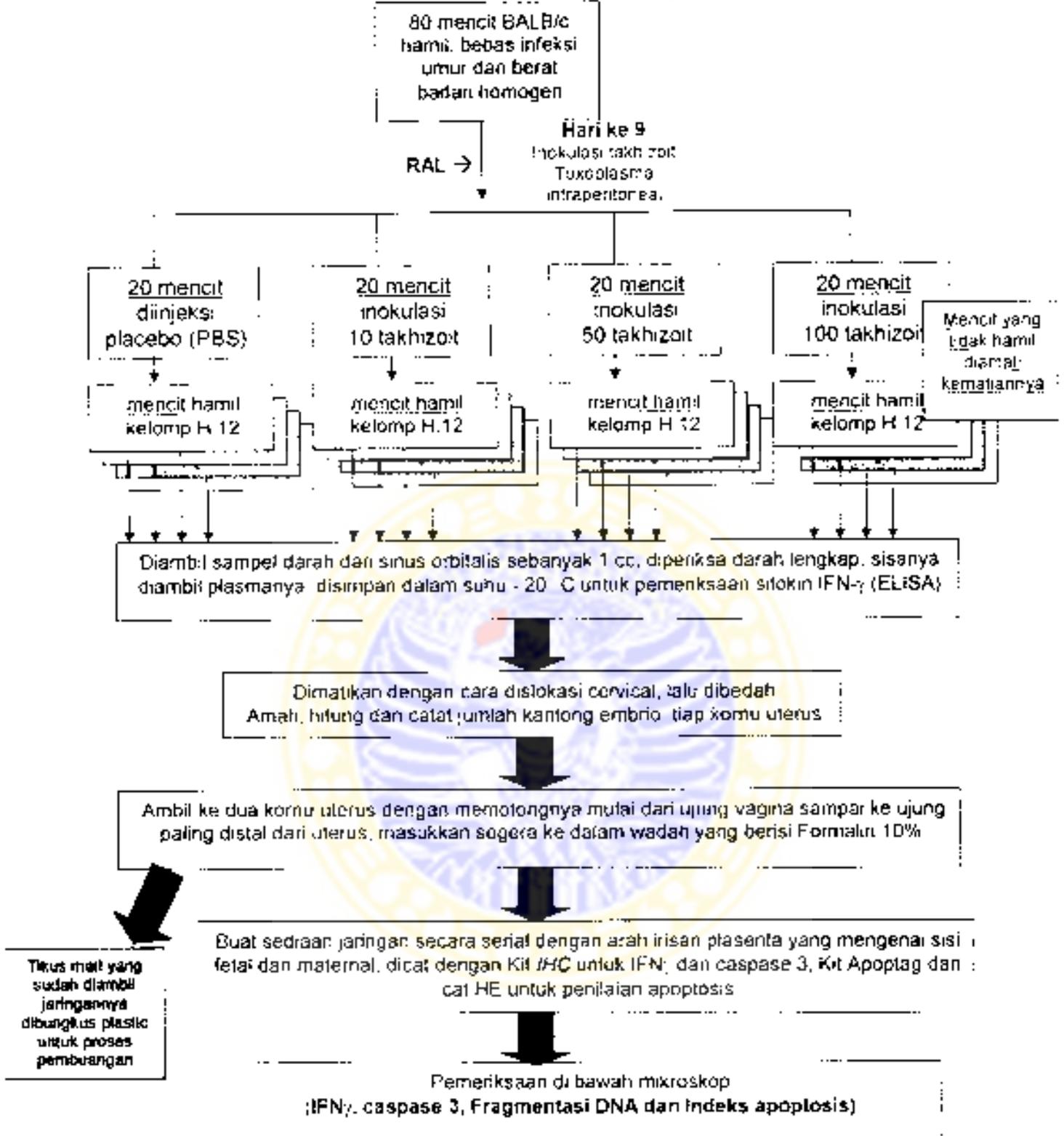
Pemeriksaan sediaan PA dengan pewarnaan HE dan *ApopTag®* dimaksudkan untuk menghitung indeks apoptosis, sesuai kriteria yang telah disebutkan di depan. Pengamatan diusahakan pada lapangan pandang yang sesuai dengan yang diamati pada sediaan *ApopTag®*. Prosedur yang sama dilakukan untuk penghitungan sel-sel yang mengekspresikan *caspase 3* (Lampiran 7 dan 8)



4.4.5.8. Penghitungan sel-sel yang mengalami apoptosis

Penghitungan sel-sel yang mengalami apoptosis dan sedidua yang diwarnai dengan *ApopTag® Peroxidase in Situ Apoptosis Detection Kit* dimaksudkan untuk memastikan jumlah sel-sel yang mengalami apoptosis. Untuk setiap slide masing-masing jenis sel trofoblas dan sedidua dihitung secara tersendiri dari 20 lapangan pandang. Prosedur yang sama dilakukan untuk penghitungan sel-sel yang mengekspresikan caspase 3 (Lampiran 7 dan 8). Hasil perhitungan indeks apoptosis dan ekspresi caspase-3 untuk sel sedidua dan trofoblas, masing-masing dimasukkan ke dalam lembar kerja (Lampiran 6).

Untuk lebih jelasnya, langkah-langkah operasional yang telah diuraikan di atas telah diringkas dan dibuat skema seperti yang dapat dilihat pada Gambar 4.4.1 dan 4.4.2.



Gambar 4.2 Langkah-langkah operasional dalam penelitian
 Keterangan: RAL = Rawa dipin dengan menggunakan Rangkaian Arak Lengkap

4.4.6. Tahap pengumpulan dan pencatatan data hasil perlakuan

4.4.6.1. Pada saat pembedahan.

Pada hari pembedahan diperoleh beberapa data yaitu jumlah takhizoit, status kebuntingan secara makroskopis, jumlah embrio dalam uterus dan pengamatan makroskopis terhadap organ-organ lain. Data-data tersebut dicatat pada lembar pencatatan data yang sudah disediakan sesuai dengan nomor mencit masing-masing (Lampiran 2)

4.4.6.2. Data lain yang diperoleh setelah pembedahan

4.4.6.2.1. Kadar sitokin IFN γ plasma (ng/ml) diperoleh dari hasil pemeriksaan ELISA yang dilakukan sesuai dengan prosedur yang berlaku (Lampiran 5), setelah semua sampel darah dari mencit bunting yang dibedah sudah terkumpul.

4.4.6.2.2. Ekspresi caspase-3 diperoleh dari penghitungan sel-sel plasenta yang mengekspresikan pada sediaan yang diwarnai secara imunohistokimia, menggunakan antibodi *anti-rabbit caspase-3*.

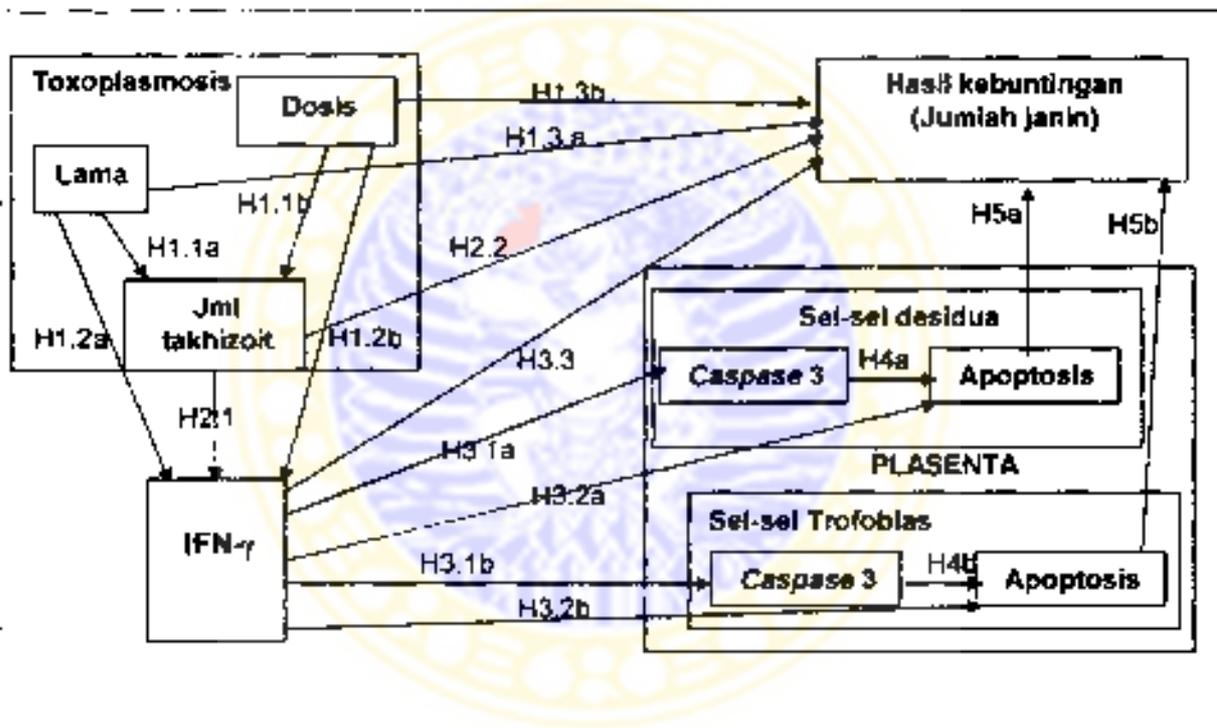
4.4.6.2.3. Jumlah sel-sel trofoblas dan desidua yang apoptosis diperoleh dari penghitungan sel pada sediaan yang diwarnai dengan pewarnaan HE (Hematoksilin Eosin) dan Apoptag Kit. Prosedur masing-masing pewarnaan dan pembacaan sel tercantum dalam lampiran 6.

4.4.7. Analisis data

4.4.7.1 Untuk membuktikan hipotesis utama dan juga subhipotesis-subhipotesis yang lain digunakan analisis *F-test Oneway Anova*, kemudian dilanjutkan

dengan *Multiple Comparisons Post Hoc test*, menggunakan perangkat lunak SPSS-10.

4.4.7.2 Untuk menguji hubungan dan pengaruh variabel-variabel yang lain secara simultan, digunakan analisis jalur (*Path Analysis*) dengan perangkat lunak AMOS GRAFIK -4. Model pengujian hipotetiknya dapat dilihat pada Gambar 4.1.



Gambar 4.3. Model hipotetik untuk pengujian pengaruh antar variabel

Keterangan :

Garis panah = hubungan pengaruh langsung yang diuji

H1.1 s/d, H1.3 a dan b = Sub hipotesis 1 (bab 3.2.1.)

H2.1, s/d H2.2 a dan b = Sub Hipotesis 2 (bab 3.2.2.)

H3.1 s/d H3.3 a dan b = Sub Hipotesis 3 (bab 3.2.3.)

H4 a dan H4. a = Sub Hipotesis 4 (bab 3.2.4.)

H5 a dan H5 a = Sub Hipotesis 5 (bab 3.2.5.)

Hasil analisis jalur

kp = koefisien jalur yaitu besarnya pengaruh antar variable yang diuji

p = p value

BAB 5

HASIL

5.1. Karakteristik sampel mencit yang diteliti

5.1.1. Mencit bunting

Sebanyak 80 ekor mencit BALB/c betina yang diperoleh dari Pusvetna Wonocolo Surabaya dan berasal dari perkawinan antar saudara, dipilih yang sudah pernah beranak satu atau dua kali, kemudian dibagi menjadi 16 kelompok sesuai dengan rencana penakuan seperti yang tertera pada Tabel 4.2. Perkawinan dilakukan dengan metoda seperti yang diuraikan pada Lampiran 1. Selanjutnya ke-80 ekor mencit tersebut semuanya dinokulasi dengan takhizoit *Toxoplasma gondii* galur RH pada hari ke-9 pasca kawin (H9 p.k.), seperti yang diuraikan dalam Lampiran 2. Ternyata setelah perkawinan dan inokulasi takhizoit *Toxoplasma gondii* pada hari pengamatan yang dijadwalkan, dari 80 mencit betina tersebut 45 ekor di antaranya menunjukkan tanda-tanda bunting secara fisik. Dengan demikian angka keberhasilan kebuntingan (*pregnancy rate*) secara fisik pada penelitian ini adalah 45/80 atau 56,25%. Hanya mencit-mencit ini yang kemudian dibedah untuk diambil sampel darah dan organ uterusnya.

Empat tahap pembedahan yang menurut jadwal akan dilakukan pada H12, H14, H16 dan H18 p.k. diajukan ke H12, H14, H15 dan H16 p.k. karena pada H15 p.k. ternyata sudah banyak mencit yang nampak sakit dan kritis akibat inokulasi. Jumlah dan distribusi mencit bunting yang diamati berdasarkan dosis inokulasi dan hari pembedahan dapat dilihat pada Tabel 5.1. Sisa mencit yang tidak bunting tidak dibedah, tetapi diikuti perkembangannya untuk menilai angka kematian akibat inokulasi dengan takhizoit *Toxoplasma gondii*, seperti diuraikan pada bab 5.1.2 berikut ini.

Tabel 5.1 Jumlah dan distribusi mencit yang pada pengamatan secara fisik nampak bunting dan diikuti pada analisis lebih lanjut

Dosis takhizot	Hari kebuntingan				Jumlah
	H12	H14	H15	H16	
0	3	2	3	2	10
10	2	3	2	4	11
50	2	4	4	2	12
100	3	3	4	2	12
Jumlah	10	12	13	10	45

5.1.2. Angka kematian mencit setelah infeksi *Toxoplasma*

Sisa mencit yang pada pengamatan secara fisik tidak termasuk karena bunting adalah berjumlah $(80 - 45) = 35$ ekor. Mencit-mencit ini diikuti terus perkembangannya sampai akhir pengamatan, yaitu sampai dengan H21 p.k., dan dijadikan sebagai kelompok khusus hanya untuk menilai tingkat virulensi inokulan dengan mengamati saat kematian. Satu ekor mencit bunting berada dalam kondisi kritis tepat pada hari pembedahan yang dijadwalkan (H16) dan kemudian mati sesaat setelah diambil darahnya. Mencit tersebut juga sempat diambil cairan peritoneumnya. Dengan demikian mencit tersebut selain termasuk dalam kelompok bunting, juga dihitung sebagai mencit yang mati akibat inokulasi. Jadi jumlah mencit dari kelompok khusus ini menjadi 36 ekor.

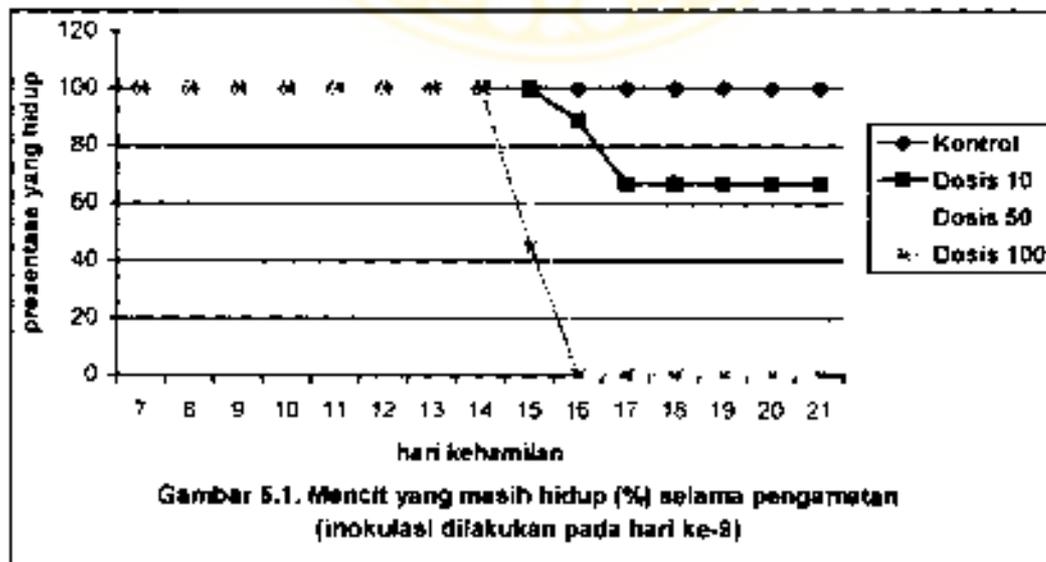
Dalam perjalanan terjadi perubahan jadwal pembedahan. Pada hasil pengamatan yang ditunjukkan pada Tabel 5.2 dan Gambar 5.1 terlihat bahwa setelah inokulasi pada H9 p.k. sampai dengan H14 p.k. belum ada mencit yang mati. Kematian mencit baru ditemukan sejak H15 p.k.. Sebenarnya pada H14 tersebut beberapa mencit terutama yang berasal dari kelompok dosis 50 dan 100 takhizot sebagian besar sudah nampak sakit dan menunjukkan tanda-tanda

krntis. Pada pengamatan lebih lanjut ternyata dari sisa mencit yang tidak bunting tersebut, kelompok dosis 50 mati sebanyak 3 ekor (37,5%) pada H15, 4 ekor (50%) pada H16 dan sisanya (12,5%) mati pada H17. Kelompok mencit dari dosis 100 takhizoit. 5 ekor (55,5%) mati pada H15 dan sisanya (44,5%) mati pada H16. Dengan demikian angka kematian 100% untuk dosis 50 dicapai pada H17, sedangkan untuk dosis 100 pada H16. Untuk dosis 10, kematian mencit terjadi sebanyak 1 ekor (11,1%) pada H16 dan 2 ekor (22,2%) pada H17. Mencit yang tersisa sebanyak 6 ekor (66,7%) tetap hidup sampai H18 bahkan sampai dengan akhir pengamatan. Mencit dari kelompok kontrol 100% tetap hidup sampai dengan selesainya pengamatan (H21) (Tabel 5.2. Gambar 5.1)

Tabel 5.2. Angka kematian mencit kelompok khusus setelah infeksi *Toxoplasma**)

Dosis takhizoit	Jumlah mencit yang mati											Mencit yang hidup	Total
	H7	H9*	H10	H11	H12	H13	H14	H15	H16	H17	H18		
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10	10
10	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2	0	6	9
50	0	0	0	0	0	0	0	3	4	1	0	0	8
100	0	0	0	0	0	0	0	5	4	0	0	0	9
Jumlah	0	0	0	0	0	0	0	8	9	3	0	16	36

*) Infeksi dilakukan pada H-9 p.k



Gambar 5.1. Mencit yang masih hidup (%) selama pengamatan (inokulasi dilakukan pada hari ke-8)

5.1.3. Mencit-mencit yang ikut serta dalam analisis setelah pembedahan

Pada bab 4 1.2 telah disebutkan bahwa sesuai dengan Rancangan Acak Lengkap maka untuk 16 kelompok perlakuan untuk setiap kelompok diperlukan paling sedikit 2 mencit, sehingga pada penelitian ini jumlah mencit bunting yang diperlukan total sebanyak 32 ekor (Musa dan Nasution, 1989). Dengan angka keberhasilan kebuntingan sebesar 45/80 (*Pregnancy rate* = 56.25%), maka jumlah sampel tersebut sudah memenuhi kriteria minimal.

Selanjutnya, dari 45 ekor mencit tersebut berdasarkan morfologi dan ukuran uterus pada pengamatan langsung yang dilakukan saat pembedahan, ternyata hanya 35 mencit yang diyakini bunting dan memenuhi kriteria masukan. Setelah dilakukan pengecekan ulang terhadap 35 mencit tersebut berdasarkan kelompoknya, ternyata distribusi mencit bunting pada tiap kelompok tidak merata, bahkan ada beberapa kelompok mencit bunting yang beranggota hanya 1 ekor. Atas dasar pertimbangan teoritik dan analisis statistik serta untuk menghindari kelompok-kelompok yang beranggota 1 mencit, maka mencit-mencit yang berasal dari kelompok H15 digabung dengan kelompok H16, sedangkan kelompok H14 seluruhnya tidak dianalisis atau dikeluarkan dari penelitian. Dengan pengelompokan ulang ini, maka jumlah perlakuan sekarang hanya tinggal 8 kelompok, yaitu 4 kelompok dosis dari H12 yang mewakili kebuntingan periode 2 yang identik dengan kehamilan trimester 2 pada manusia, dan 4 kelompok dosis dari H15 dan H16 mewakili kebuntingan periode 3, yang identik dengan kehamilan trimester 3 pada manusia. Untuk selanjutnya semua pengamatan yang dilakukan pada H12 disebut periode 2, dan pada H15-16 disebut periode 3. Jumlah seluruh sampel akhirnya tinggal 24 mencit, yaitu 9 mencit yang berasal dari periode 2; dan 15 mencit dari periode 3. Semua mencit

dan kelompok yang baru diambil data tentang jumlah janin, jumlah takhizoit dalam cairan peritoneum, kadar IFN- γ dalam darah. Seluruh organ uterus diambil untuk pemeriksaan histopatologi dan imunohistokimia. Tabel 5.3, menunjukkan jumlah mencit bunting setelah pengelompokan yang baru

Tabel 5.3 Jumlah dan distribusi mencit bunting setelah pengelompokan ulang

Kelompok	Periode 2	Periode 3	Jumlah
Kontrol	2	3	5
Dosis 10	2	5	7
Dosis 50	2	3	5
Dosis 100	3	4	7
Jumlah	9	15	24

5.1.4. Jumlah janin rata-rata pada masing-masing kelompok mencit

Pada tahap pembedahan, dilakukan pengamatan langsung terhadap organ-organ abdomen termasuk hepar, limpa, usus dan ginjal dan sebelum organ-organ tersebut dikeluarkan dari rongga perut, diambil fotonya secara keseluruhan. Khusus untuk uterus, bentuk, ukuran uterus dan jumlah lobus pada masing-masing kornu dihitung dan dicatat. Gambar 5.2. dan 5.3. menunjukkan kondisi uterus ketika masih berada di dalam rongga perut dan setelah disimpan dalam larutan formalin sebelum dibuat sediaan histopatologi. Tabel 5.4 dan Gambar 5.4 menunjukkan jumlah rata-rata janin pada tiap kelompok mencit. Jumlah tersebut dihitung dari jumlah lobus atau embrio pada kedua *cornu uteris* mencit bunting yang diamati secara makroskopis pada saat pembedahan. Jumlah janin pada uterus hami yang mengalami regresi sempurna dihitung 0.



Gambar 5.2. Perbandingan jumlah embrio dan ukuran uterus dari masing-masing kelompok mencit bunting pada saat pembedahan.

Keterangan Kode Digt 1{dosis} D = kontrol, A = dosis 10, B = dosis 50, C = dosis 100
Digt 2 (hari kebuntingan) P = H12, R = H15, S = H16

Pada Gambar di atas nampak perbandingan bentuk, ukuran uterus dan jumlah embrio di dalam uterus sesaat setelah pembedahan dalam keadaan jaringan masih segar. Jumlah embrio dan ukuran uterus makin kecil seiring dengan lama infeksi dan umur kebuntingan mencit (arah ke kanan), dan dosis infeksi (arah ke bawah). Kelompok kode AP (dosis 10, H-12) tidak dapat ditampilkan karena foto-foto kabur/rusak. Pada periode 3 selain ditemukan pengecilan ukuran uterus dan jumlah embrio juga ditemukan perubahan warna organ hepar (rusak/berbintik-2) (†) pada 2 ekor mencit dan kelompok dosis 100 takhizod (CR1 dan CS1). Pada pengamatan langsung juga didapatkan 3 ekor mencit mengalami abortus, tepat pada hari pembedahan (BR5, BS4 dan CS5).



Gambar 5.3. Perbandingan ukuran uterus dan jumlah embrio dari masing-masing kelompok mencit bunting sebelum dibuat sediaan histo PA (sudah di formalin)

Kode . Digit 1(dosis) 0 = kontrol, A = dosis 10, B = dosis 50, C = dosis 100

Digit 2 (hari kebuntingan) P = H12, R = H15, S = H18.

Foto-fotouterus yang sudah dipisahkan dan mencit masing-masing kelompok dan disimpan dalam formalin 10%. Foto-foto tersebut diambil sebelum dibuat sediaan histopatologi. Nampak bahwa jumlah embrio dan ukuran uterus cenderung mengecil seiring dengan lama infeksi (arah ke samping kanan) dan tingkat dosis infeksi yang diberikan (arah ke bawah). Ukuran uterus paling kecil bahkan mengalami regresi (tanda panah) ditemukan pada kelompok jangka waktu infeksi yang paling lama (H18) dan dosis yang tinggi (50 lakhizot = BS2 dan 100 lakhizot = CS5).

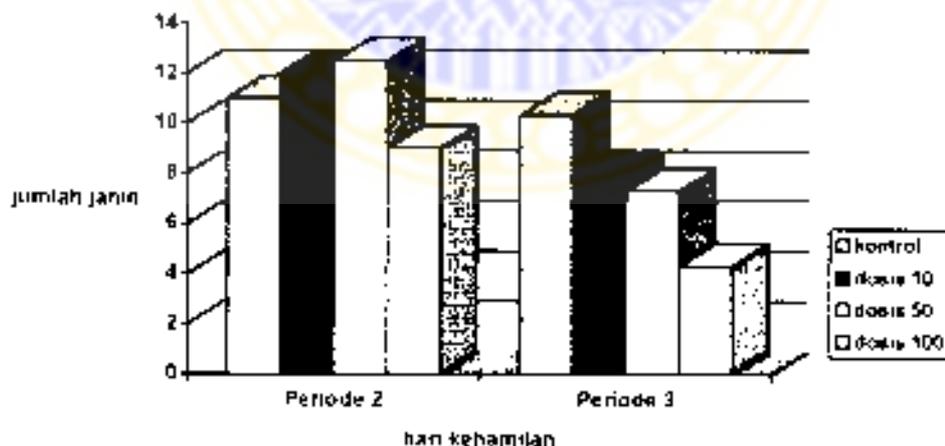
Pada Tabel 5.4. dan Gambar 5.4 nampak bahwa pada periode 2 belum ada perbedaan jumlah janin antar kelompok dosis yang bermakna ($p = 0,246$) Penurunan jumlah janin seiring dengan peningkatan dosis infeksi baru terlihat bermakna pada pengamatan periode 3 ($p = 0.032$).

Tabel 5.4 Jumlah janin rata-rata tiap kelompok mencit dan p -value *Post Hoc ANOVA test*

Kelompok	Periode 2 (rerata ± 1SD)	Periode 3 (rerata ± 1SD)
Kontrol	10,33 ± 2,31 $p = 1,000^*$	10,40 ± 1,52 $p = 1,000^*$
Dosis 10	12,00 ± 2,31 $p = 0,865^*$	8,00 ± 1,76 $p = 0,592^*$
Dosis 50	12,50 ± 0,58 $p = 0,75^*$	7,33 ± 4,93 $p = 0,473^*$
Dosis 100	9,00 ± 3,90 $p = 0,907^*$	4,32 ± 4,48 $p = 0,024^*$
	$p = 0,246^{**}$	$p = 0,032^{**}$

^{*}) p -value dibandingkan dengan kontrol (*Post Hoc Test*)

^{**}) p -value antar kelompok (*Oneway ANOVA*)



Gambar 5.4. Jumlah janin rata-rata pada tiap kelompok dosis Pada periode 3 nampak gambaran penurunan jumlah janin berdasarkan kelompok dosis infeksi ($p = 0.032$)

5.1.5. Hasil hitung takhizoit dalam cairan peritoneum mencit

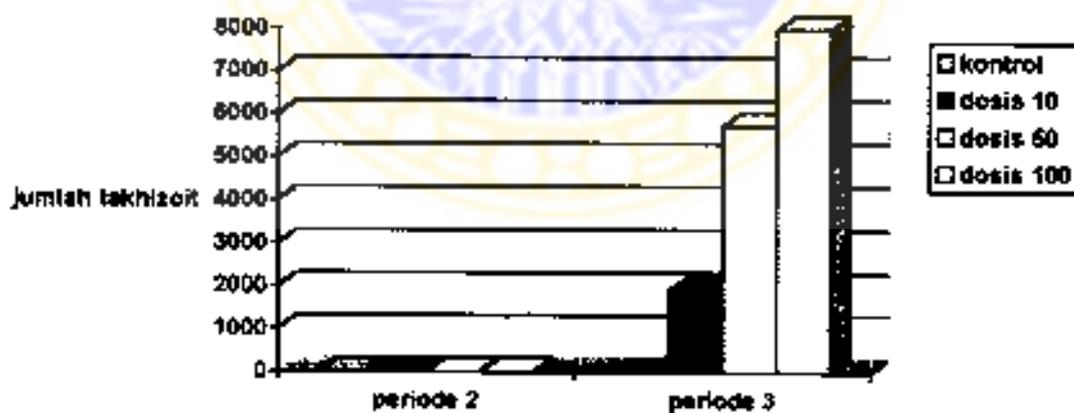
Tabel 5.5. dan Gambar 5.5. menunjukkan hasil penghitungan rata-rata jumlah takhizoit yang terkandung di dalam bilasan seluruh cairan peritoneum. Pembilasan rongga peritoneum dilakukan setelah mencit dimatikan dan sebelum dibedah untuk diamati dan diambil jaringan uterusnya.

Tabel 5.5. Jumlah takhizoit rata-rata ($\times 10^4/\mu\text{m}^3$) pada tiap kelompok dan *p*-value *F* test

Kelompok	Periode 2	Periode 3
	(rerata \pm 1SD)	(rerata \pm 1SD)
Kontrol	0,00 \pm 0,00 <i>p</i> = 1,000*	0,00 \pm 0,00 <i>p</i> = 1,000*
Dosis 10	0,625 \pm 0,144 <i>p</i> = 0,00*	1882,25 \pm 1858,61 <i>p</i> = 0,142*
Dosis 50	1,375 \pm 0,144 <i>p</i> = 0,00*	5725,00 \pm 1246,80 <i>p</i> = 0,00*
Dosis 100	1,583 \pm 0,129 <i>p</i> = 0,00*	7975,00 \pm 1701,57 <i>p</i> = 0,00*
	<i>p</i> = 0,000**	<i>p</i> = 0,000**

*) *p*-value dibandingkan dengan kontrol (*Post Hoc Test*)

***) *p*-value antar kelompok (*Oneway ANOVA*)



Gambar 5.5. Jumlah takhizoit rata-rata tiap kelompok. Peningkatan jumlah takhizoit pada masing-masing kelompok dosis lebih nampak berbeda pada periode 3

Adanya peningkatan jumlah takhizoit yang bermakna pada masing-masing kelompok dosis, sudah terlihat sejak pengamatan pada periode 2 (Tabel 5.5 Gambar 5.5). Pada periode 2, jumlah takhizoit pada ke tiga kelompok studi berbeda bermakna bila dibanding dengan kelompok kontrol ($p = 0,00$, *Oneway ANOVA*). Ada perbedaan bermakna antara jumlah rata-rata takhizoit pada tiga kelompok studi bila kelompok dosis 10 dibandingkan dengan kelompok dosis 50 dan 100 ($p = 0,00$), tetapi antara kelompok dosis 50 dan 100 peningkatan jumlah tersebut tidak berbeda bermakna ($p = 0,098$, *Post Hoc Test*). Jumlah takhizoit ini terus meningkat seiring dengan waktu sampai dengan hari pembedahan berikutnya (periode 3). Pada periode 3 (*Post Hoc Test*) jumlah takhizoit kelompok dosis 10 tetap berbeda bermakna bila dibandingkan kelompok dosis 50 dan 100 ($p = 0,000$), tetapi justru tidak bermakna bila dibandingkan kelompok kontrol ($p = 0,142$). Perbedaan jumlah takhizoit antara kelompok dosis 50 dan 100 takhizoit tetap tidak bermakna ($p = 0,055$) (selengkapnya lihat Lampiran 9).

5.1.6. Hasil pengukuran kadar IFN- γ darah mencit pasca inokulasi.

Pengambilan darah untuk pengukuran kadar IFN- γ plasma, dilakukan pada hari pembedahan sebelum mencit dimatikan. Setiap mencit diambil darahnya dan sinus orbitalis sebanyak 1-2 cc. Plasma darah dipisahkan dengan sentrifus dan disimpan di dalam apendorf pada suhu -40°C , sambil menunggu pemeriksaan kadar IFN- γ bersama sampel yang diperoleh pada hari pembedahan berikutnya. Pemeriksaan kadar IFN- γ dilakukan dengan metoda ELISA, sesuai dengan prosedur menurut Kit-Manual (Lampiran 3). Pembacaan dilakukan dengan ELISA READER untuk setiap sampel masing-masing 3 kali. Dari hasil angka-angka adsorbansi diambil nilai rata-rata kemudian dicari kurva bakunya. Hasil

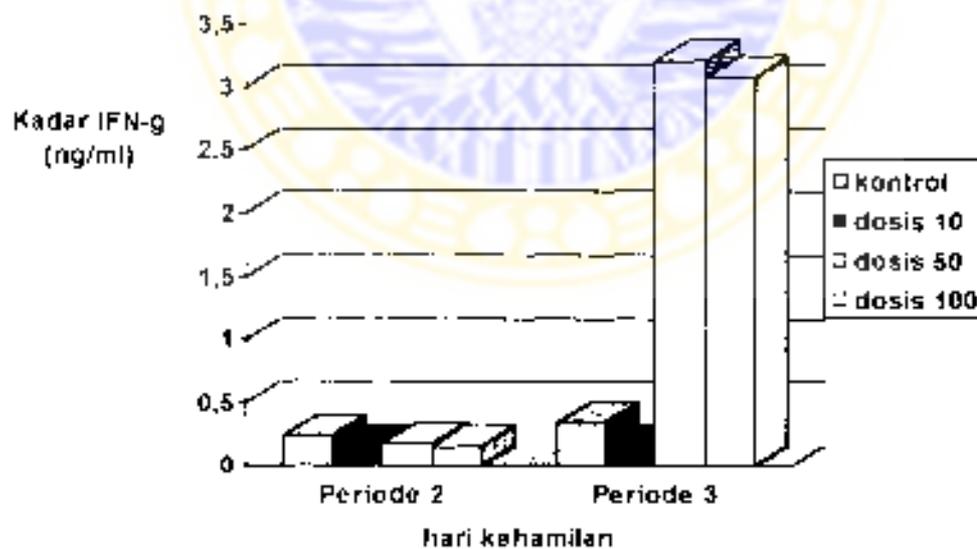
persamaan kurva oaku dikalikan dengan angka-angka adsorbansi, kemudian dikonversi ke nilai konsentrasi (Tabel 5.6. Gambar 5.6)

Tabel 5.6 Kadar IFN- γ rata-rata (ng/ml) tiap kelompok dan *p-value Post Hoc*

Kelompok	ANOVA test	
	Periode 2 (rerata \pm 1SD)	Periode 3 (rerata \pm 1SD)
Kontrol:	0,2357 \pm 0,0033 <i>p</i> = 1,000*	0,3416 \pm 0,0591 <i>p</i> = 1,000*
Dosis 10	0,1481 \pm 0,0541 <i>p</i> = 0,284*	1,6489 \pm 1,4061 <i>p</i> = 0,045*
Dosis 50	0,1734 \pm 0,0129 <i>p</i> = 0,559*	3,2118 \pm 0,1255 <i>p</i> = 0,000*
Dosis 100	0,1532 \pm 0,0886 <i>p</i> = 0,272* <i>p</i> = 0,266**	3,0806 \pm 0,2439 <i>p</i> = 0,000* <i>p</i> = 0,000**

**p-value* dibandingkan dengan kelompok kontrol (*Post Hoc Test*)

***p-value* antar kelompok (*Oneway ANOVA*)



Gambar 5.6 Kadar IFN-g rata-rata tiap kelompok. Kenaikan kadar IFN-g pada masing-masing kelompok dosis baru terlihat berbeda bermakna pada trimester 3 (*p* < 0,05).

Pada Tabel 5.6 dan Gambar 5.6. nampak bahwa pada periode 2, kadar IFN- γ dalam plasma mencit pada masing-masing kelompok dosis belum menunjukkan perbedaan yang bermakna. Pada periode 2 tersebut kadar IFN- γ dari kelompok kontrol ditemukan lebih tinggi dibandingkan 3 kelompok lain yang mendapat perlakuan, tetapi perbedaan ini tidak bermakna baik pada analisis ANOVA ($p = 0,266$), maupun *Post Hoc Test* ($p > 0,05$) (Lampiran 9). Peningkatan kadar IFN- γ di dalam plasma mencit pada masing-masing kelompok dosis terlihat nyata setelah periode 3 ($p = 0,000$ Oneway ANOVA). Pada periode 3 (*Post Hoc Test*) kadar rata-rata IFN- γ di dalam plasma mencit bunting pada kelompok kontrol berbeda bermakna dibandingkan dengan kelompok dosis 10 ($p = 0,046$), maupun dengan kelompok dosis 50 dan dosis 100 ($p = 0,00$). Perbedaan bermakna juga ditemukan pada perbandingan antara kelompok dosis 10 dengan dosis 50 ($p = 0,008$) tetapi tidak dengan dosis 50 dan 100 takhizoit ($p = 0,998$). Kadar rata-rata IFN- γ pada kelompok mencit yang diinfeksi *Toxoplasma gondii* dengan dosis 50 takhizoit ($3,2118 \pm 0,1255$ ng/ml) justru lebih tinggi dibandingkan dengan kelompok dosis 100 takhizoit ($3,0806 \pm 0,2439$ ng/ml).

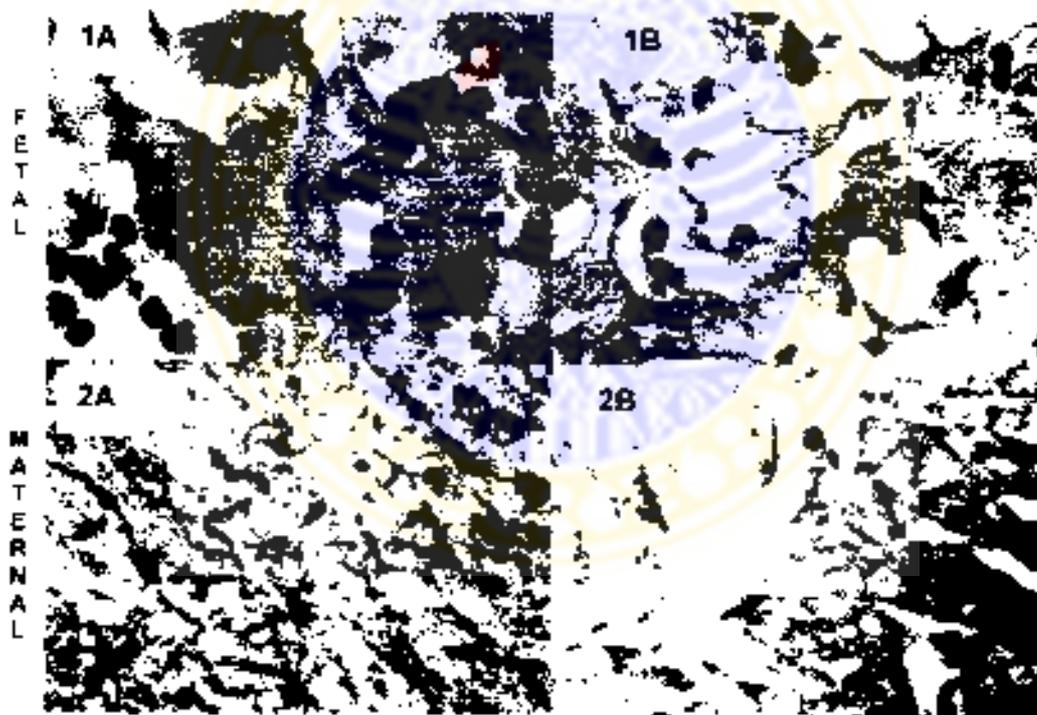
5.1.7. Hasil pemeriksaan histopatologi jaringan plasenta

Dan 24 ekor mencit yang dibedah dan memenuhi kriteria, masing-masing diambil sampel jaringan uterusnya, dan dari masing-masing kornu uterus kiri dan kanan diambil satu kantong embrio. Setiap mencit mempunyai 2 sampel kantong embrio, yang kemudian dibuat irisan 3 sediaan histo-PA. Satu *slide* diwarnai secara imunohistokimia menggunakan antibodi *anti-rabbit caspase-3*, satu *slide* diwarnai dengan Hematoksin Eosin sebagai pewarnaan dasar untuk sediaan PA dan satu *slide* sisanya diwarnai menggunakan kit Apoptag, berdasarkan

prosedur yang diuraikan pada Lampiran 6a, 6b dan 6c. Penghitungan jumlah sel-sel trofoblas dan desidua yang apoptosis pada sediaan irisan uterus/jaringan plasenta dilakukan sesuai dengan prosedur yang diuraikan pada Lampiran 7.

5.1.7.1. Ekspresi caspase-3 pada sel-sel desidua dan trofoblas

Gambar 5.7. menunjukkan sel-sel trofoblas dan desidua yang mengekspresi enzim caspase-3 pada sediaan jaringan uterus yang diwarnai secara imunohistokimia menggunakan antibodi *anti-rabbit Caspase-3*, menurut prosedur yang diuraikan pada Lampiran 6a. Tabel 5.7.1.; Gambar 5.7.1.a. dan 5.7.1 b. menunjukkan jumlah sel-sel trofoblas dan desidua yang mengekspresi enzim caspase-3 tersebut.



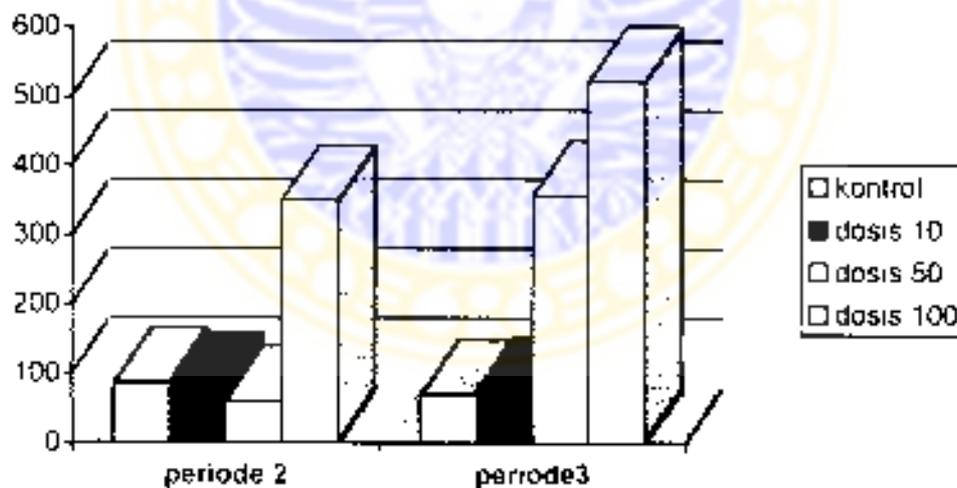
Gambar 5.7. Ekspresi enzim caspase-3 pada sel-sel trofoblas (1A dan 1B) dan desidua (2A dan 2B) pada pewarnaan IHC dengan antibodi *anti-rabbit Caspase-3* irisan jaringan plasenta menci H12 (1A) dan H15 (1B); sel-sel entrosi berinti (tanda panah kecil), menunjukkan bahwa daerah tersebut adalah daerah fetal. 1B, jumlah entrosit berinti tidak sebanyak H12 (Suzuki *et al* 1997) Tanda panah panjang sel-sel trofoblas (1A, 1B) dan desidua (2A, 2B) yang mengekspresi caspase-3 aktif, sitoplasmanya berwarna coklat (Pizem and Cor, 2003)

Tabel 5.7 Jumlah rata-rata sel trofoblas dan desidua yang mengekspresi caspase 3 pada masing-masing kelompok mencit dengan pewarnaan imunohistokimia menggunakan antibodi anti rabbit caspase-3 dan *p-value* Post Hoc ANOVA test

Dosis	Periode 2		Periode 3	
	Trofoblas	Desidua	Trofoblas	Desidua
Kontrol	86,50 ± 27,58 <i>p</i> = 1,000*	30,00 ± 0,00 <i>p</i> = 1,000*	70,20 ± 27,68 <i>p</i> = 1,000*	42,40 ± 32,97 <i>p</i> = 1,000*
Dosis 10	79,50 ± 47,38 <i>p</i> = 1,000*	44,00 ± 32,53 <i>p</i> = 0,952*	72,60 ± 46,06 <i>p</i> = 1,000*	41,20 ± 25,52 <i>p</i> = 1,000*
Dosis 50	61,50 ± 56,06 <i>p</i> = 1,000*	43,75 ± 41,68 <i>p</i> = 0,923*	498,18 ± 203,38 <i>p</i> = 0,543*	27,83 ± 39,39 <i>p</i> = 0,835*
Dosis 100	350,17 ± 503,49 <i>p</i> = 0,804*	17,17 ± 13,92 <i>p</i> = 0,925*	521,88 ± 511,19 <i>p</i> = 0,137*	26,88 ± 18,89 <i>p</i> = 0,111*
	<i>p</i> = 0,577**	<i>p</i> = 0,439**	<i>p</i> = 0,047**	<i>p</i> = 0,616**

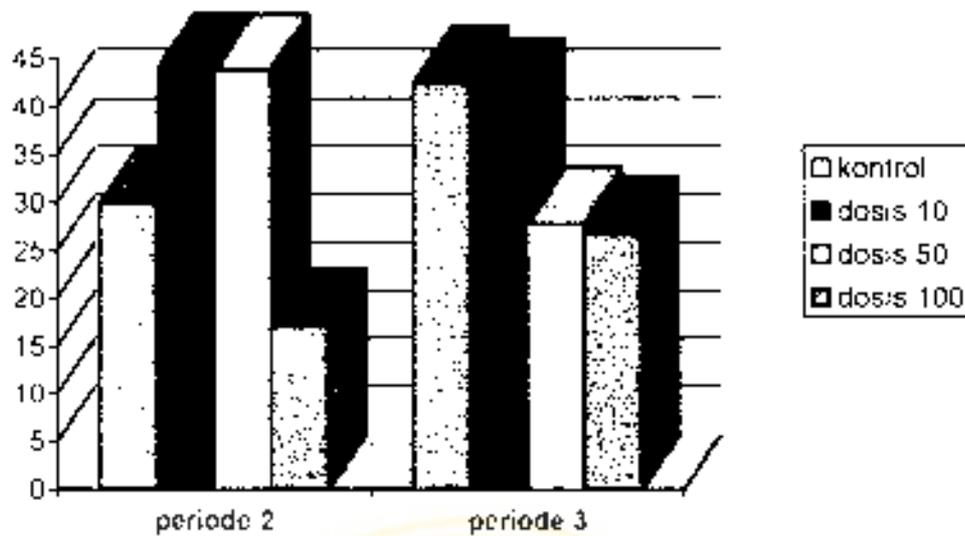
**p-value* dibandingkan dengan kelompok kontrol (Post Hoc Test)

***p-value* antar kelompok (Oneway ANOVA)



Gambar 5.7.1 a Jumlah rata-rata sel trofoblas yang mengekspresi caspase 3 pada pewarnaan secara imunohistokimia

Peningkatan ekspresi caspase-3 pada corpus luteum trofoblas hanya dijumpai pada periode 3 (*p* = 0,047)



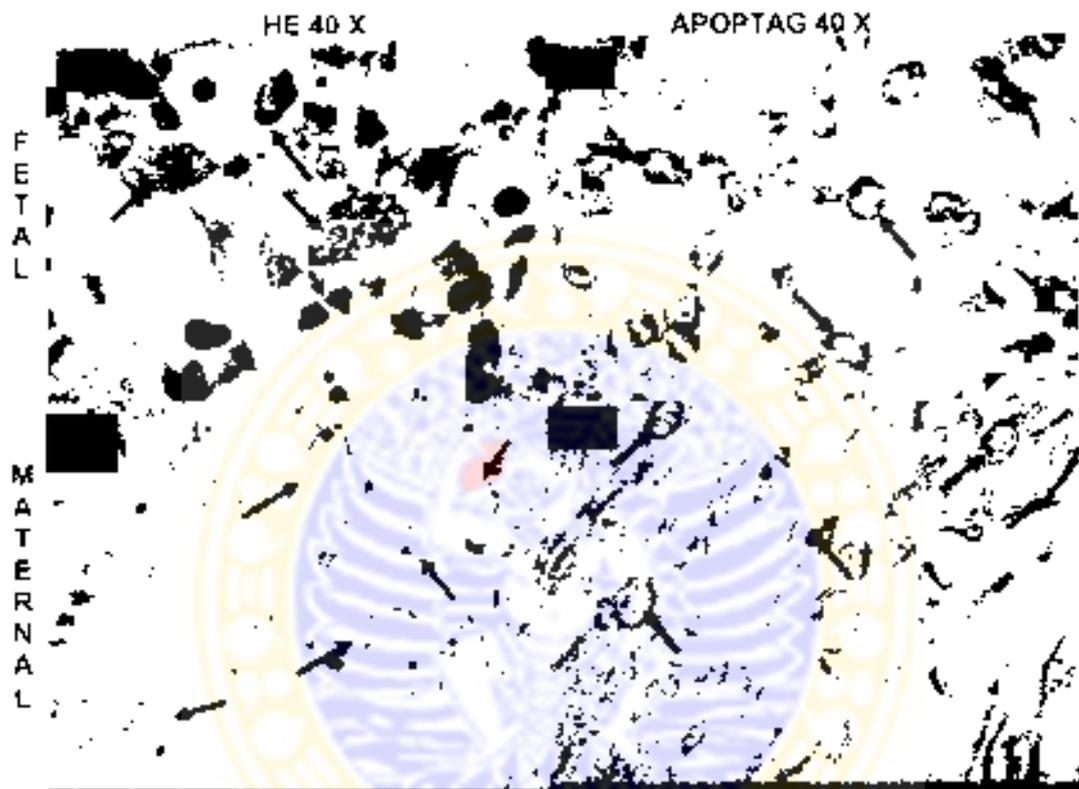
Gambar 5.7.1 b. Jumlah rata-rata sel desidua yang mengekspresi caspase-3 pada pewarnaan secara imunohistokimia. Tidak terdapat adanya peningkatan ekspresi caspase-3 ($p = 0,616$)

5.2. Hasil pengamatan secara kualitatif secara histopatologi

5.2.1. Gambaran sel-sel apoptotik pada pewarnaan HE dan Apoptag

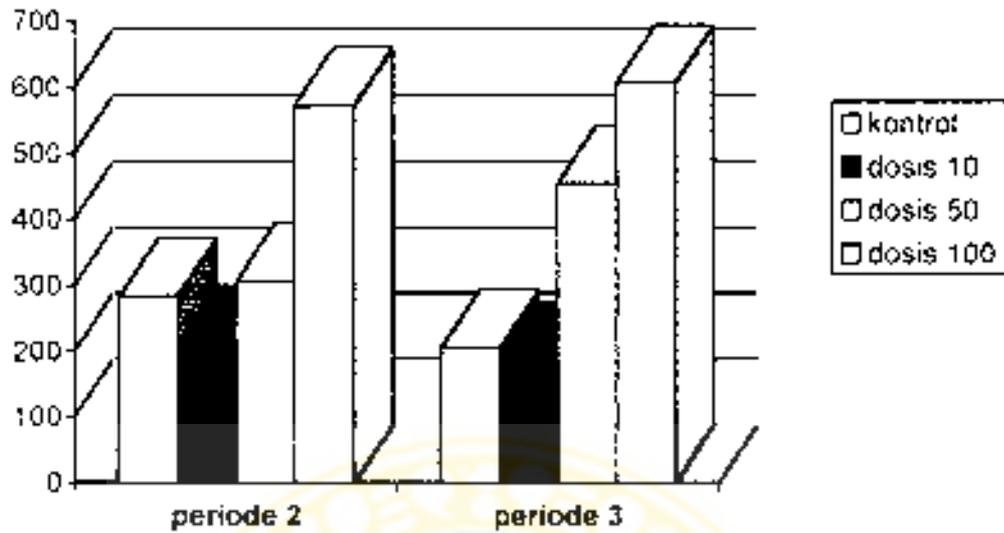
Gambar 5.8 menunjukkan perbedaan gambaran sel-sel trofoblast dan desidua yang mengalami apoptotik, dari sediaan jaringan yang diwarnai dengan pewarnaan HE dan Apoptag sesuai dengan yang diuraikan pada Lambaran 6b dan 6c. Nampak kekhususan penampilan sel-sel apoptotik pada masing-masing sediaan. Tabel dan gambar berikutnya menunjukkan indeks apoptosis yaitu jumlah rata-rata sel-sel trofoblast dan desidua yang mengalami apoptosis diantara populasi sel yang bersangkutan. Jumlah sel yang mengalami apoptosis dihitung pada 20 lapangan pandang dengan pembesaran 1000 X. Dengan metoda ini diperkirakan jumlah sel yang teramati sudah terhitung di antara 1000-1500 sel yang berada dalam lapangan pandang tersebut (Soini, 1998; Pizem and

Cor 2003). Indeks apoptosis sel-sel trofoblas dan desidua pada sedaan yang diwarnai dengan HE disajikan pada Tabel 5.8.1 dan Gambar 5.8.1.a, 5.8.1.b, sedang yang dari sedaan dengan pewarnaan Apoptag disajikan pada tabel 5.8.2. dan Gambar 5.8.2.a, 5.8.2.b.

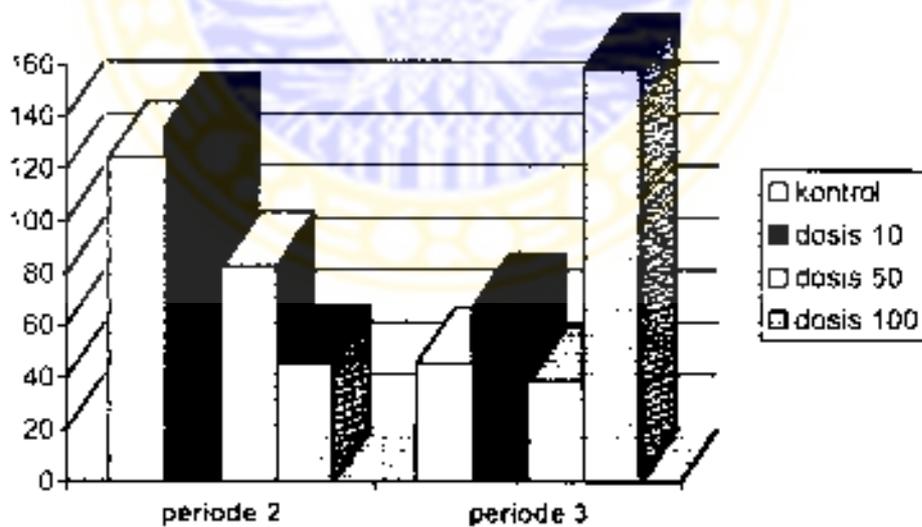


Gambar 5.8. Gambaran apoptosis dan sel-sel trofoblas dan desidua pada sedaan histo-PA dengan pewarnaan HE (1A dan 2A) dan Apoptag (1B dan 2B).

- 1A, 1B Insan jaringan plasenta mencol pada H12 di daerah fetal. Sel-sel eritrosit yang bening (tanda panah kecil (→)) menunjukkan bahwa daerah pergamatan tersebut adalah bagian fetal (Suzuki et al., 1997). 1A (HE 40X) Tanda panah panjang (→) menunjukkan sel-sel sinitio-trofoblas yang mengalami apoptosis dalam berbagai fase (crescent, kondensasi khromatin dan inti yang mengalami fragmentasi (Conen, 1993). 1B (Apoptag 40X) Hanya sel-sel yang sudah mengalami fragmentasi DNA yang memberikan warna sesuai khromogen yang dipakai (→) (coklat) (Anonymous 1998).
- 2A, 2B Insan jaringan plasenta mencol pada H12 di daerah maternal. Ditemukannya sel-sel desidua menandakan bahwa sedaan tersebut berasal dari uterus mencol bunting (Iloke and King, 1995). 2A (HE 40x) nampak sel-sel desidua yang apoptotik dalam berbagai fase (crescent, kondensasi khromatin dan inti yang mengalami fragmentasi (→) (Conen, 1993). 2B (Apoptag 40X) Hanya sel-sel yang sudah mengalami fragmentasi DNA (→) yang memberikan warna sesuai khromogen (coklat) (Anonymous 1998).



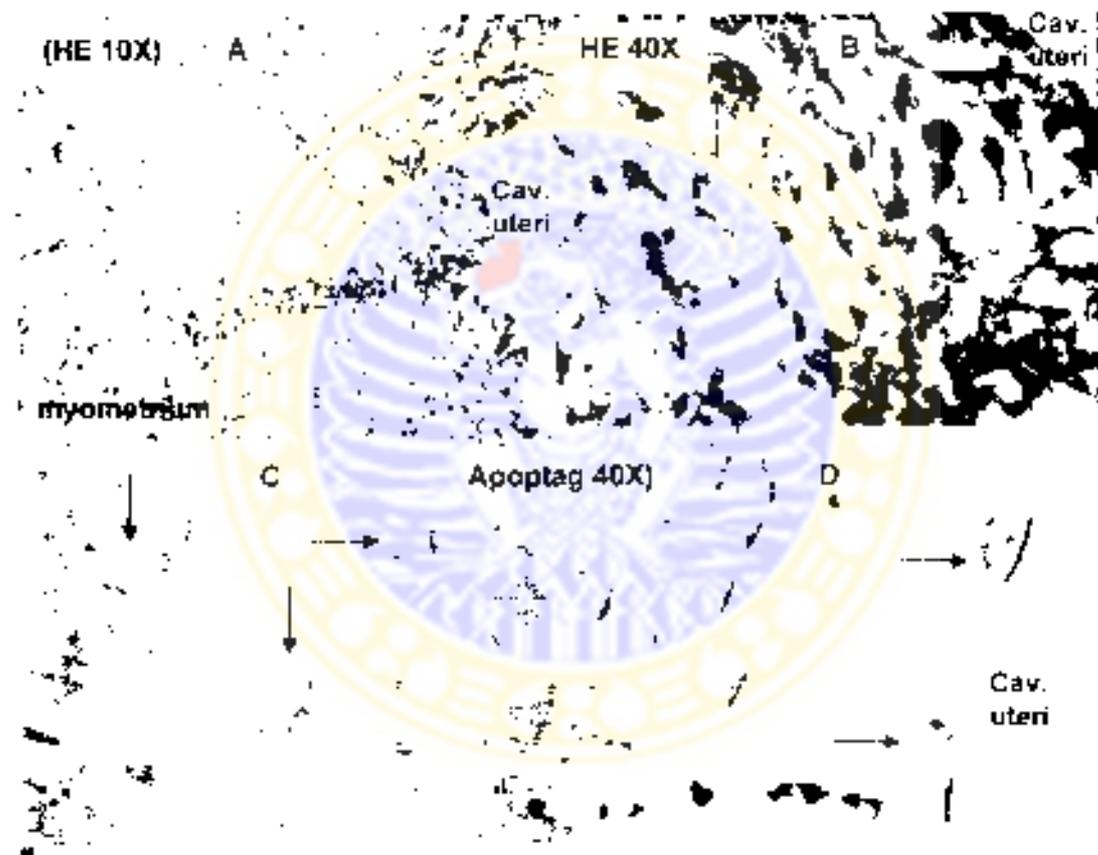
Gambar 5.8.2 a Indeks apoptosis rata-rata sel trofoblas pada pewarnaan Apoptag
Perbedaan indeks apoptosis dijumpai setelah periode 3 ($p < 0.05$)



Gambar 5.8.2 b Indeks apoptosis rata-rata sel desidua pada pewarnaan Apoptag
Tidak ditemukan peningkatan indeks apoptosis antar dosis bahkan pada periode 2 nampak menurun ($p > 0.05$)

5.2.2. Gambaran jaringan uterus bunting yang mengalami regresi sempurna

Sediaan jaringan uterus mencit yang diduga mengalami regresi sempurna sengaja diambil dan ditampilkan pada makalah ini, untuk membuktikan bahwa jaringan tersebut benar-benar mengandung sel-sel desidua, yang berarti bahwa di dalam uterus tersebut pernah terjadi kebuntingan dan kemudian terhenti. Sel-sel trofoblas sudah mengalami apoptosis sempurna dan janin mengalami resorpsi sehingga nampak cavum uteri yang kosong (Gambar 5.9.A dan 5.9.B)



Gambar 5.9. Irisan jaringan uterus hamster yang mengalami regresi sempurna

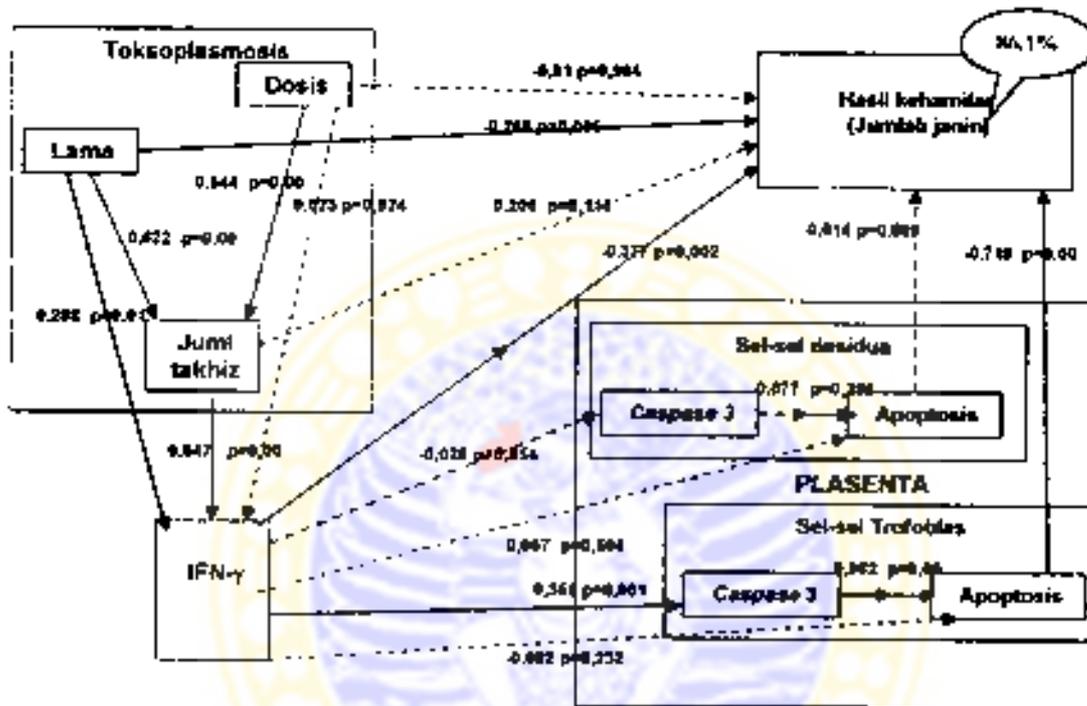
Pada Gambar A, B, C dan D nampak sel-sel desidua yang memastikan bahwa uterus tersebut dalam keadaan bunting. Gambar A (HE 10X), B (HE 40X) dan D (Apoptag 40X) adalah irisan jaringan yang menunjukkan cavum uteri yang kosong dan tidak ditemui lagi sel-sel trofoblas. Gambar C (Apoptag 40X) menunjukkan sel-sel desidua di bagian lain dari uterus yang tidak berdekatan dengan cavum uteri. Nampak juga sel-sel desidua yang mengalami apoptosis (tanda panah) pada Gambar C dan D.

5.3. Hasil analisis jalur dari variabel yang diamati

Berdasarkan kerangka konsep dan metoda pengujian hipotesis yang telah diuraikan pada Bab 4, maka hubungan antar variabel dan data yang diperoleh telah diuji menggunakan analisis jalur (*Path Analysis*) dengan perangkat lunak AMOS GRAFIK-4. Gambar berikut ini menunjukkan hasil analisis jalur dengan mendudukan toksoplasmosis yang mengandung variabel dosis dan lama infeksi sebagai variabel bebas, kemudian dilihat pengaruhnya terhadap jumlah janin secara langsung dan melalui jalur yang dikaji dalam penelitian ini, yaitu jumlah takhizoit, kadar IFN γ , ekspresi caspase 3 dan apoptosis pada sel-sel trofoblas dan desidua. Karena variabel dosis dan lama infeksi termasuk metoda pertakuan, maka walaupun tidak termasuk dalam hipotesis, pada analisis jalur ini ke dua hal tersebut juga dianalisis sebagai variabel tersendiri. Dengan analisis jalur ini maka hubungan antar masing-masing variabel dapat terlihat lebih rinci.

Ternyata infeksi *Toxoplasma* pada mencit memang dapat menyebabkan penurunan jumlah janin, dan pada penelitian ini nampak bahwa pengaruh lama infeksi (-0,269; $p=0,005$) lebih besar dibanding pengaruh dosis inokulasi (-0,01; $p= 0,904$). Dosis dan lama infeksi sama-sama berpengaruh signifikan terhadap jumlah total takhizoit dalam cairan peritoneum, tetapi pengaruh lama infeksi (0,622; $p=0,00$) lebih besar dibanding pengaruh dosis infeksi (0,544; $p=0,00$). Dosis, lama infeksi dan jumlah takhizoit total setelah beberapa hari pertakuan, menyebabkan peningkatan kadar IFN γ dalam plasma dengan koefisien pengaruh yang berbeda. Kenaikan kadar IFN γ dalam plasma dipengaruhi langsung oleh jumlah total takhizoit (0,647 $p = 0,000$). Faktor lama infeksi juga berpengaruh terhadap peningkatan kadar IFN γ plasma (0,288; $p= 0,01$), dan lebih besar dibanding pengaruh dosis infeksi (0,023; $p=0,824$). Jumlah takhizoit di dalam

cairan peritoneum yang identik dengan keberadaan parasit di rongga peritoneum, ternyata secara langsung tidak menyebabkan penurunan jumlah janin (0,206; $p=0,114$). Pada analisis tersebut nampak bahwa peningkatan kadar IFN γ plasma menurunkan jumlah janin secara bermakna (-0,377; $p=0,002$). (Gambar 5.10.)



Gambar 5.10.. Analisis jalur pengaruh toksoplasmosis terhadap jumlah janin

'Toksoplasmosis' mengandung dua variabel yaitu dosis dan lamanya, yang masing-masing diperlakukan sebagai variabel bebas. Koefisien path, menunjukkan besarnya pengaruh antar variabel nilai p menunjukkan kemaknaan. Pengaruh antar variabel bermakna bila $p \leq 0,05$. Nampak bahwa jumlah janin lebih dipengaruhi oleh lamanya infeksi (-0,269; $p=0,00$) dibanding oleh dosis inokulasi (0,01, $p = 0,904$). Jumlah takhizoid lebih tergantung lama infeksi dibanding dosis infeksi (0,622, $p=0,00$ vs 0,544, $p=0,00$). Kadar IFN γ juga lebih dipengaruhi lama (0,288; $p=0,01$ vs 0,023, $p=0,824$). Tidak ada pengaruh langsung antara jumlah takhizoid dengan jumlah janin (0,206, $p=0,114$). Kenaikan IFN γ menyebabkan penurunan jumlah janin (-0,377; $p=0,002$) dan kenaikan ekspresi caspase-3 pada sel-sel trofoblas (0,358; $p=0,001$), tetapi tidak berpengaruh pada ekspresi caspase-3 pada sel-sel desidua (-0,028; $p=0,858$). Ekspresi caspase-3 pada sel-sel trofoblas berpengaruh langsung terhadap apoptosis (0,982, $p=0,00$) tetapi pada sel-sel desidua hal ini tidak dijumpai (0,077, $p=0,395$). Peningkatan kadar IFN γ tidak berpengaruh langsung pada apoptosis, baik pada sel-sel trofoblas (-0,062; $p=0,232$) maupun desidua (0,057, $p=0,504$). Penurunan jumlah janin dipengaruhi oleh kenaikan apoptosis sel-sel trofoblas (-0,718, $p=0,00$), tetapi tidak oleh sel-sel desidua (0,014; $p=0,809$). Tanda panah garis lurus menunjukkan hubungan langsung yang bermakna, tanda panah garis putus-putus menunjukkan hubungan tidak bermakna. Angka di dalam kurung (callout) menunjukkan besarnya pengaruh seluruh variabel yang terlibat dalam sistem terhadap variabel yang bersangkutan. Selengkapnya lihat lampiran 10.

Pada analisis lebih lanjut ternyata peningkatan kadar IFN γ berpengaruh terhadap apoptosis sel-sel trofoblas, tetapi tidak secara langsung, melainkan melalui peningkatan ekspresi enzim *caspase-3* pada sel-sel trofoblas sendiri. Pengaruh peningkatan kadar IFN γ terhadap peningkatan ekspresi *caspase-3* pada sel-sel trofoblas cukup bermakna (0,359; $p = 0,001$), dan peningkatan *caspase-3* ini juga meningkatkan apoptosis sel-sel trofoblas (0,962; $p = 0,000$). Peningkatan kadar IFN γ tidak berpengaruh terhadap apoptosis sel-sel desidua, baik secara langsung (0,057; $p = 0,504$) maupun melalui pengaruh terhadap ekspresi *caspase 3* (-0,026; $p = 0,858$) terhadap apoptosis sel-sel desidua (0,074; $p = 0,386$). Apoptosis yang terjadi pada sel-sel trofoblas berpengaruh besar terhadap penurunan jumlah janin (-0,718; $p = 0,000$), tetapi tidak demikian halnya dengan apoptosis pada sel-sel desidua (0,011; $p = 0,844$). Angka-angka yang tercantum pada Gambar 10 adalah koefisien jalur yang menunjukkan pengaruh total (*Standardized Regression Weights*). Pengaruh langsung atau tidak langsung antar variabel dapat dilihat pada Lampiran 10. Pada Lampiran 10 dapat dilihat bahwa pengaruh seluruh faktor yang dianalisis (*Squared Multiple Correlation*) dalam hubungan antara infeksi toxoplasma terhadap jumlah janin adalah 0,861 atau 86,1%.

BAB 6

PEMBAHASAN

Pembahasan berikut disajikan atas dasar data dan hasil analisis pengaruh antar variabel, sesuai dengan kerangka konsep yang telah disampaikan di depan.

6.1. Pengaruh infeksi *Toxoplasma* pada kehamilan

Pengaruh infeksi *Toxoplasma* (toksoplasmosis) pada kehamilan merupakan topik yang menarik dan masih menjadi perdebatan ilmiah karena toksoplasmosis telah dikenal sebagai penyakit yang menyebabkan berbagai bentuk kegagalan kehamilan seperti abortus, kelahiran prematur, bayi lahir dengan berat badan rendah, IUGR, lahir cacat dan lahir mati. Dari berbagai bentuk kegagalan kehamilan tersebut, abortus adalah yang paling sering dilaporkan. Para peneliti menyebutkan hubungan antara toksoplasmosis dengan abortus dalam angka-angka yang bervariasi. Sebagian dari mereka menyebutkan hubungan tersebut hanya sekitar 1,38% - 7,1% (Stojanovic, 1998; Crucerescu, 1996), tetapi sebagian lain menyebutkan bahwa hubungan toksoplasmosis dengan abortus mencapai 55% - 73,3% (Altintas, 1997; Zargar, 1998; Owen, 1998b). Seberapa besar hubungan antara toksoplasmosis dengan bentuk kegagalan kehamilan yang lain, sampai saat ini belum diperoleh angka-angka yang pasti. Walaupun telah banyak penelitian yang dilakukan tentang hubungan tersebut, namun sejauh ini masih belum diperoleh hasil yang memuaskan.

6.1.1. Infeksi *Toxoplasma* pada mencit bunting menurunkan jumlah janin

Berdasarkan batasan operasional yang disebut pada bab 4.2.8, kegagalan kebuntingan pada mencit didefinisikan sebagai terhentinya pertumbuhan janin,

yang manifestasinya dapat berupa keluarnya hasil konsepsi sebelum umur kebuntingannya cukup (*abortus* dan *preterm delivery*), perdarahan per vaginam (*fluxus*), adanya regresi total, sebagian atau pertumbuhan infantil (*IUGR*), rusak, mati bahkan sampai hilangnya bentuk janin dan/atau plasenta (*resorpsi*) di kantong embrio yang bersangkutan (Smith and Mangkoewidjojo, 1987, Benirschke, 2002). Pada penelitian ini terhentinya kebuntingan dipastikan atas pengamatan sediaan uterus dengan mikroskop. Berdasarkan teori bahwa proses desidualisasi pada mencit baru terjadi setelah adanya implantasi (Loke and King, 1995), maka ditemukannya sel-sel desidua pada pemeriksaan histopatologi jaringan uterus, menandakan bahwa mencit yang bersangkutan telah mengalami kegagalan kebuntingan akibat perlakuan (Gambar 5.9).

Pada penelitian ini dari pengamatan pada bentuk dan ukuran uterus terlihat bahwa pada kelompok dosis 50 dan 100 takhizoit pada H16 ukuran uterusnya paling kecil / tidak berlobus (Gambar 5.2. dan 5.3). Uterus mencit yang bentuknya tidak berlobus atau seperti uterus mencit tidak bunting tetapi como mengalami dilatasi, diperhitungkan sebagai uterus hamil yang mengalami kegagalan kebuntingan dan janin telah diresorpsi. Asumsi ini diperkuat dengan hasil pengamatan mikroskopis, di mana ternyata pada sediaan irisan jaringan uterus tersebut ditemukan sel-sel desidua, sedangkan cavum uteri telah kosong (Gambar 5.9.A, B, C dan D). Juga ditemukan fakta bahwa di antara 24 mencit yang diamati, pada H16 (periode-3) terdapat 3 ekor yang mengalami kelahiran lebih awal (*preterm labor*) disertai perdarahan per vaginam (*fluxus*), yaitu masing-masing 1 ekor berasal dari dosis 50 dan 2 ekor mencit dan dosis 100 takhizoit (data tidak disertakan). Hasil analisis ANOVA pada penelitian ini menunjukkan bahwa penurunan jumlah janin akibat infeksi *Toxoplasma gondii* galur RH pada

mencit BALB/c bunting), terjadi terutama setelah H6-7 p.u.H15-16 p.k. (Tabel 5.4 dan Gambar 5.4) atau pada periode-3 ($p = 0,032$). Dan hasil pengamatan dan analisis statistik yang telah dilakukan pada penelitian ini dapat disimpulkan bahwa toksoplasmosis dapat menyebabkan kegagalan kebuntingan. Jenis manifestasi kegagalan kebuntingan yang terjadi sulit dideteksi, namun terjadinya kegagalan kebuntingan tersebut pada akhirnya dapat diketahui atas dasar jumlah janin yang tersisa (lihat definisi operasional 4.2.9.) Jadi telah terbukti bahwa infeksi *Toxoplasma* pada mencit bunting menurunkan jumlah janin.

6.1.2. Pengaruh dosis dan lama infeksi *Toxoplasma* pada kehamilan

Abortus, kelahiran prematur, IUGR dan lahir mati pada dasarnya adalah bentuk kegagalan kehamilan akibat penolakan hasil konsepsi yang terjadi lebih dini dari waktu yang telah diprogramkan secara normal, namun faktor-faktor apa yang memicu terjadinya penolakan tersebut masih belum dapat dijelaskan. Telah diketahui bahwa penyebab kegagalan kehamilan sangat kompleks dan multifaktorial. Berbagai faktor penyebab yang dapat diidentifikasi sampai saat ini antara lain hanyalah faktor genetik, anatomik, endokrinologik, imunologik dan infeksi. Pada Tabel 2.2.5 terlihat bahwa peran faktor infeksi atau *microbiologic* terhadap kejadian abortus tidak lebih dari 5% (Pietrantonio, 2002). Walaupun perannya kecil, infeksi merupakan faktor penyebab yang penting dan perlu diperhitungkan sebagai penyebab abortus (Brent and Beckman, 1994), maupun jenis kegagalan kehamilan yang lain. Hal ini juga mengingatkan bahwa berdasarkan klasifikasi penyebab kegagalan kehamilan yang dikemukakan oleh penulis lain, faktor infeksi tidak disebutkan secara tersendiri. Tidak tertutup kemungkinan bahwa faktor infeksi sebenarnya termasuk dalam kelompok *unknown*.

unexplained atau *idiopathic* (Tho, 1976; Coulam, 1986; Hatasaka, 1994; Pietrantonio, 2002). Kemungkinan faktor infeksi oleh mikro-organisme yang tergolong TORCH ikut berperan terhadap terjadinya kegagalan kehamilan yang lain, seperti *IUGR*, *preterm labor*, *stillbirth* dan lahir cacat, serta timbulnya manifestasi klinik yang lain (Tabel 2.2.6), telah dikemukakan oleh beberapa penulis (Klein and Remington, 1995; Creasy and Resnik, 1999).

Pada bab 2 telah disebutkan bahwa ada sederetan nama penyakit yang dikenal sebagai penyebab kegagalan kehamilan dan termasuk jajaran TORCH. Istilah TORCH yang semula hanya merupakan singkatan dari empat jenis penyakit yaitu *Toksoplasmosis*, *Rubella*, *Cytomegalo-virus* dan *Herpes simplex*, sekarang telah berkembang lebih luas. Huruf O diartikan sebagai *Other Diseases* yakni *syphilis*, infeksi *streptococcus grup B*, *listeriosis* dan lain-lain, *Chlamydia trachomatis* dimasukkan ke dalam huruf C, sedang *Hepatitis B virus*, *Hepatitis C virus*, *Human Immuno-deficiency virus (HIV)*, *Human Papilloma virus (HPV)* dan *Human Parvovirus* dimasukkan ke dalam huruf H (Sofowon, 1991; Stray-Pedersen, 1997). Dengan demikian anggota jajaran TORCH saat ini semakin banyak, sehingga kemungkinan jajaran penyakit infeksi menjadi penyebab kegagalan kehamilan juga semakin besar.

Walaupun demikian, di antara sekian banyak mikro-organisme yang sudah disebut, sampai sekarang belum ada penemuan yang menyebutkan mikroorganisme mana yang paling dominan atau lebih bertanggung jawab terhadap kegagalan kehamilan, baik abortus, *preterm labor*, *IUGR*, lahir cacat atau lahir mati (Remington, 1995; Klein and Remington, 1995; Creasy and Resnik, 1999). Sebagai contoh pada infeksi *Chlamydia trachomatis*, walaupun insidens antibodi *antichlamydea* pada kelompok penderita yang mengalami abortus

berulang dilaporkan cukup tinggi, tetapi abortus berulang justru tidak dihubungkan dengan *Chlamydia*, melainkan lebih dihubungkan dengan antibodi maternal terhadap *HIV*, *syphilis* dan kolonisasi *Streptococcus grup B* di vagina (Pietrantonio, 2002, Makhseed, 2004)

Penelitian ini dilakukan dengan menggunakan isolat *Toxoplasma gondii* galur RH sebagai bahan inokulan. Hal ini dilakukan atas dasar pertimbangan bahwa isolat ini telah tersedia dan banyak digunakan pada berbagai riset ilmiah. Namun demikian karena peneliti belum mengetahui tingkat virulensi isolat parasit tersebut secara pasti, maka untuk menentukan dosis inokulan pada penelitian yang sebenarnya dilakukan penelitian pendahuluan (optimasi dosis). Dan 80 ekor mencit BALB/c betina dengan berat rata-rata 17 gram, dibagi menjadi empat kelompok, masing-masing terdiri dari 20 ekor, kemudian diinfeksi tachizoit *Toxoplasma gondii* galur RH dengan dosis 10, 100 dan 1000 tachizoit (ditambah kelompok kontrol) lalu diamati saat kematiannya. Ternyata pada kelompok kontrol didapatkan 1 ekor mencit mati pada H8 p.i., pada kelompok dosis 100 masing-masing 1 ekor mati pada H8 p.i. dan H10 p.i.; sedang pada kelompok dosis 1000 didapatkan 11 ekor mencit mati, semuanya terjadi pada H8 p.i.. Mencit yang mati dan berasal dari kelompok kontrol ternyata mempunyai berat badan paling rendah di antara semua mencit yang diteliti (hanya 12 gram), sehingga patut diduga bahwa mencit ini mati bukan disebabkan oleh infeksi *Toxoplasma* (lihat Lampiran 11). Mencit yang berasal dari kelompok dosis 10 tidak ada yang mati. Dengan demikian sampai dengan 10 hari pengamatan, diperoleh hasil bahwa jumlah mencit yang masih hidup (*survival rate*) masing-masing adalah 95% pada kelompok kontrol, 100% pada kelompok dosis 10, 90% pada kelompok dosis 100 dan 45% pada kelompok dosis 1000 tachizoit (Sardjono, 2003). Atas dasar hasil

penelitian tersebut maka untuk jangka waktu pengamatan selama 8-10 hari p.i.. pada penelitian ini digunakan dosis 10 sebagai dosis terendah, dosis 100 sebagai dosis tertinggi dan dosis 50 takhizoit sebagai dosis tengah.

Dan hasil pengamatan dan analisis ANOVA, ternyata infeksi *Toxoplasma gondii* galur RH pada mencit BALB/c pada awal dan kehamilan (periode 1) menyebabkan penurunan jumlah janin. Pengaruh infeksi dengan dosis bertingkat (10, 50 dan 100 takhizoit) pada jumlah janin ketika infeksi baru berjalan 3-4 hari (periode 2) belum signifikan ($p = 0,246$), dan baru terlihat signifikan ($p = 0,032$) setelah infeksi berjalan 6-7 hari (periode 3). Pengaruh yang signifikan tersebut hanya dijumpai bila kelompok dosis inokulasi 100 takhizoit dibandingkan dengan kelompok kontrol ($p = 0,024$: *Post Hoc*). Dan analisis tersebut terbukti bahwa toksoplasmosis berpengaruh negatif terhadap kehamilan, tetapi pengaruh ini baru terlihat setelah infeksi berjalan beberapa lama. Dan Analisis jalur (Gambar 5.10.) terlihat bahwa infeksi *Toxoplasma gondii* ternyata menyebabkan penurunan jumlah janin, dan faktor lama berlangsungnya infeksi lebih berperan dan bermakna ($-0,269$; $p = 0,005$) dibandingkan faktor dosis ($-0,01$; $p = 0,904$).

6.1.3. Pengaruh hubungan hospes-parasit pada manifestasi klinik

Dan uraian tersebut di atas dapat disimpulkan bahwa pengaruh toksoplasmosis pada hasil kehamilan pada penelitian ini adalah -26,9%, atau lebih dan seperempat dari seluruh penyebab gangguan kehamilan. Angka ini cukup besar dan jauh berbeda bila dibandingkan angka yang dikemukakan oleh Stojanovic (1998) dan Crucerescu (1998) yang hanya berkisar antara 1,38% - 7,1%. Perbedaan ini mungkin disebabkan karena angka yang dilaporkan tersebut terbatas pada kasus abortus pada manusia berdasarkan data sero-epidemiologis

Dari data tersebut galur parasit penyebab tidak dapat dideteksi, padahal telah disebutkan bahwa galur *Toxoplasma* yang banyak menginfeksi manusia dan hewan ternak pada populasi umum, kebanyakan berasal dari type II (Zenner, 1993; Sibley and Howe, 1996; Dupouy-Camet, 1997). Penelitian ini menggunakan mencit galur BALB/c karena telah terbukti memenuhi syarat sebagai hewan coba, khususnya dalam kajian tentang toksoplasmosis (Roberts and Alexander, 1992; Guo and Johnson, 1996; Sibley and Howe, 1996; Dubey *et al.*, 1999). Adapun isolat yang digunakan pada penelitian ini adalah *Toxoplasma gondii* galur RH, yaitu galur yang sudah dikenal virulen. Oleh karena itu patut diduga bahwa perbedaan hasil yang mencolok tersebut disebabkan oleh galur *Toxoplasma gondii* yang diinfeksi.

Walaupun hipotesis bahwa infeksi *Toxoplasma gondii* menurunkan jumlah janin telah terbukti, namun masih diperlukan pemikiran untuk menjelaskan mekanisme mengapa faktor lama infeksi *Toxoplasma gondii* terhadap hasil kehamilan lebih berpengaruh dibandingkan faktor dosis. Satu hal yang dapat dikemukakan di sini adalah bahwa manifestasi kegagalan kehamilan akibat infeksi *Toxoplasma gondii* terjadi menurut kaidah hubungan hospes-parasit (*host-parasite relationship*). Kaidah *host-parasite relationship* mengatakan bahwa proses patologik dan manifestasi klinik dari suatu penyakit infeksi sangat tergantung pada interaksi antara tiga faktor, yaitu hospes/inang (*host*), parasit (*agent*) dan lingkungan (*environment*). Faktor hospes meliputi jenis organisme, spesies, ras atau galur, jenis kelamin, umur, gizi dan faktor-faktor lain. Semua faktor tersebut dapat mempengaruhi tingkat kepekaan dan kekebalan hospes terhadap penyakit. Faktor *agent*, selain jenis/spesies dan galur parasit, sifat genetik juga ikut menentukan virulensi, resistensi dan kemampuan multiplikasi

serta jumlah parasit yang menginfeksi (*parasite burden*) setelah waktu berjalan. Faktor lingkungan ikut berpengaruh terhadap kehidupan hospes maupun kehidupan parasitnya. Kemampuan dan kecepatan parasit untuk membelah diri di dalam sel-sel jaringan tubuh hospes sangat ditentukan oleh interaksi antara hospes dan parasit tersebut. Lingkungan dan faktor-faktor lain yang membuat daya tahan hospes menurun, justru akan menguntungkan bagi parasitnya, dan demikian pula sebaliknya (Warren, 1993; Siles, 1997, Baratawijaya, 2002).

Sejak terjadi infeksi *Toxoplasma gondii*, baik melalui oral atau diinjeksikan intraperitoneal, segera terjadi infeksi fase akut yang disebabkan karena adanya multiplikasi parasit di dalam sel tubuh hospes. Takhizoit membelah diri secara *endodyogeny* dalam vakuola yang spesifik yang terdapat di dalam sel (vakuola parasitoforus), menyebabkan hancurnya sel-sel hospes yang ditempati (*infected cells*), kemudian diikuti dengan invasi ke sel-sel yang terdekat di sekitarnya, dan demikian seterusnya (Remington, 1995, Dubey, 1998). Kecepatan membelah diri dan kemampuan menghancurkan sel-sel hospes dipengaruhi oleh sifat genetik masing-masing galur parasit, dan hal inilah yang menentukan tingkat virulensi (Dardé, 1996). Pada dosis rendah, khususnya inokulum dan galur yang kurang virulen, infeksi akut segera dapat dialasi oleh sistem pertahanan tubuh alami. Dalam kondisi demikian parasit berubah menjadi bentuk yang bermultiplikasi lambat (*bradizoit*) dan kemudian proses menuju ke arah fase khronik (Remington *et al.*, 1995; Sibley and Howe, 1996; Kasper, 1998; Dubey *et al.*, 1998, Denney, 1999). Kondisi ini akan berbeda bila inokulum *Toxoplasma gondii* berasal dari galur yang virulen. Untuk galur yang virulen, segera setelah inokulasi intraperitoneal, keseimbangan antara keberadaan dan kemampuan makrofag bebas untuk memfagosit parasit serta kemampuan parasit untuk membelah diri

di dalam sel-sel makrofag, menentukan kelangsungan hidup parasit serta jumlah takhizoit intraperitoneal. Bila makrofag bebas mampu memfagosit, maka parasit akan mati. Sebaliknya bila parasit lebih kuat, maka ia akan terus membelah dan di dalam makrofag, kemudian pecah dan menginvasi makrofag yang lain (Dubey, 1998, Pappas and Wardrop, 2001). Bila makrofag gagal memfagositosis parasit atau parasit mampu masuk ke dalam sel makrofag dan limfosit, maka hal ini akan memudahkan bagi parasit untuk menyebar secara hematogen, sehingga meningkatkan derajat parasitemia (Kasper and Boothroyd, 1993, Denney, 1999).

Untuk menimbulkan dampak patologis yang berarti, diperlukan derajat parasitemia tertentu yang dapat melewati ambang batas ketahanan hospes. Hal ini tentu saja membutuhkan waktu. Pada infeksi *Toxoplasma*, waktu yang diperlukan untuk proses multiplikasi parasit hingga mencapai tingkat parasitemia yang optimal, sangat tergantung kepada galur parasit. Galur yang virulen mempunyai kemampuan multiplikasi yang cepat dan daya invasi ke dalam sel-sel hospes yang lebih kuat. Multiplikasi yang dilakukan oleh *Toxoplasma* adalah secara pembelahan biner, berarti pertambahan jumlah parasit terjadi menurut deret ukur, di mana setiap periode multiplikasi jumlah parasit akan bertambah sebanyak dua kali jumlah semula. Pada analisis *Post Hoc Oneway ANOVA* (Tabel 5.5), nampak bahwa pada periode 2, jumlah takhizoit pada mencit dan kelompok dosis 10 berbeda nyata dengan kelompok dosis 50 dan 100 ($p = 0.00$), tetapi kelompok dosis 50 tidak berbeda dengan dosis 100 ($p = 0.098$); sedangkan pengaruhnya pada mencit yang diinfeksi belum terlihat nyata.

Pada penghitungan jumlah takhizoit periode-3 ditemukan peningkatan jumlah takhizoit pada ke tiga kelompok dosis secara nyata ($p=0.00$ ANOVA), tetapi pada *Post Hoc Oneway ANOVA* ternyata jumlah takhizoit pada kelompok

dosis 10 tidak berbeda dengan kontrol ($p = 0,142$). Selanjutnya, jumlah takhizoit pada mencit kelompok dosis 10 berbeda nyata dengan kelompok dosis 50 dan 100 ($p = 0,00$) tetapi perbedaan jumlah takhizoit antara kelompok dosis 50 dan 100 tetap tidak bermakna ($p = 0,055$). Sementara itu didapatkan fakta dari kelompok khusus, bahwa pada H15-16 mencit yang diinfeksi dengan dosis 50 dan 100 semuanya sudah mati (*survival rate* = 0%, Tabel 5.2).

Dan hasil tersebut nampak bahwa setelah infeksi, derajat parasitemia mulai H9 (periode-1) sampai dengan H12 (periode-2), belum cukup optimal untuk menimbulkan dampak patologik yang nyata. Dampak yang bermakna baru nampak setelah infeksi berlangsung lebih lama, yaitu setelah H15-16 (periode-3), dan hanya dijumpai pada dosis 50 dan 100. Hal ini menunjukkan bahwa batas dosis optimal infeksi *Toxoplasma gondii* galur RH untuk mencit mempunyai kisaran yang sangat sempit. Dosis yang terlalu kecil (kurang dari 10 takhizoit) mungkin belum menimbulkan dampak patologis yang dapat diamati, tetapi dosis yang terlalu tinggi (lebih dari 100 takhizoit) menyebabkan kematian mencit yang relatif cepat. Dosis optimal yang diperoleh dari hasil penelitian pendahuluan ternyata tidak cocok ketika diterapkan pada penelitian ini. Dosis 100 takhizoit yang pada tahap optimasi sampai hari ke 10 p.i. memberi *survival rate* sebesar 90%, dan pada penelitian ini pada hari ke 7 p.i. ternyata sudah mencapai 0%, menunjukkan bahwa virulensi inokulum *Toxoplasma gondii* yang dipakai pada penelitian ini telah meningkat. Hal ini disebabkan karena bahan inokulum tersebut berasal dari hasil penangkaran yang berulang dan bahan yang dipakai pada tahap optimasi. Ternyata memang disebutkan bahwa penangkaran dari inokulum *Toxoplasma gondii* pada mencit secara berulang dapat meningkatkan daya virulensi (Evans, 1992; Guo and Johnson, 1996; Sibley and Howe, 1996).

Ditemukannya fakta bahwa dampak patologik akibat infeksi *Toxoplasma gondii* galur RH terhadap buah kebuntingan pada mencit lebih dipengaruhi oleh lama infeksi dibanding oleh dosis infeksi; dan terjadinya kematian mencit ternyata masih berhubungan dengan dosis infeksi, memberi indikasi bahwa mekanisme kematian pada mencit tidak sama dengan mekanisme gangguan patologik terhadap buah kebuntingan. Dikatakan bahwa penyebab kematian pada infeksi *Toxoplasma* akut pada mencit percobaan berhubungan erat dengan tingkat parasitemia yang tinggi, yang kemudian diikuti oleh peradangan dan nekrosis di jaringan paru, liver dan otak (Sibley and Howe, 1996). Pada penelitian lain terbukti bahwa pada mencit yang diinfeksi oleh *Toxoplasma gondii* galur RH, terjadi kerusakan jaringan hepar pada hari ke-8 pasca inokulasi (p.i.), atau tahap akhir dari replikasi parasit. Kerusakan jaringan tersebut adalah berupa degenerasi lemak (*fatty liver degeneration*) dan *hydropic vacuolization* dengan sedikit apoptosis (Mordue, 2001).

Pada pengamatan makroskopis saat pembedahan dalam penelitian ini, ukuran hepar pada mencit-mencit kelompok dosis 100 pada hari 15-16 p.k. nampak membesar dan warnanya tidak merah kecoklatan lagi tetapi berubah berbintik-bintik kuning (Gambar 5.3.). Pada penelitian ini tidak dilakukan pemeriksaan jaringan hepar secara mikroskopis, tetapi pada penelitian yang pendahuluan yang juga menggunakan *Toxoplasma gondii* galur RH sebagai bahan inokulan, derajat nekrosis jaringan hepar meningkat sesuai dengan lama infeksi hanya ditemukan pada kelompok dosis inokulasi 10 takhizoit ($p < 0,05$). Pada kelompok dosis 100 takhizoit, derajat nekrosis lebih tinggi dari kelompok kontrol sudah dijumpai sejak H4 p.i. namun kenaikan tersebut hanya terjadi sampai H6 p.i., dan bahkan pada H8 dan H10 p.i. ditemukan menurun. Mencit-

mencit dan kelompok dosis 1000 sudah mati pada H8 p.i., sehingga tidak dapat dilakukan pemeriksaan jaringan (Sardjono, 2003)

6.1.4. Pengaruh keberadaan parasit di jaringan pada hasil kehamilan

Bahwa infeksi *Toxoplasma gondii* jalur RH pada mencit bunting menyebabkan penurunan jumlah janin, secara umum sudah dapat dibuktikan, namun jalur utama mekanisme terjadinya hal tersebut belum dapat dijelaskan dengan baik. Seberapapun dosis tachizoit *Toxoplasma gondii* yang diinokulasikan, setelah waktu tertentu jumlahnya akan meningkat. Sesuai dengan kaidah *dose-effects dependency*, maka pemberian dosis yang bertingkat pada hewan coba selayaknya juga menyebabkan dampak yang bertingkat. Pada analisis jalur (Gambar 5.10.), nampak bahwa lama dan dosis infeksi sama-sama berpengaruh pada kenaikan jumlah tachizoit, tetapi pengaruh lama infeksi (0,622 $p=0,00$) lebih besar dibandingkan dosis infeksi (0,544 $p=0,00$). Dari analisis ini ternyata pengaruh jumlah tachizoit di rongga peritoneum mencit pada hasil kebuntingan tidak bermakna (0,206 $p=0,114$) sehingga disimpulkan bahwa keberadaan dan jumlah tachizoit tidak berpengaruh secara langsung pada hasil kebuntingan. Fakta ini sesuai dengan hasil penelitian yang dilakukan oleh beberapa peneliti terdahulu, baik pada hewan coba maupun pada manusia.

Peneliti terdahulu menyebutkan bahwa kegagalan kehamilan akibat infeksi *Toxoplasma gondii* terjadi akibat adanya infiltrasi parasit ke jaringan plasenta (Kasper *et al.*, 1993, Remington, 1995, Kasper, 1998). Sehubungan dengan hal tersebut, Owen (1998a, 1998b) melakukan percobaan pada 15 ekor induk biri-biri yang diinfeksi dengan 2000 ookista secara oral pada usia kebuntingan 80-90 hari. Ternyata pada hari ke 10, 12 dan 13 pasca inokulasi (p.i.), berturut-turut 8, 2 dan

1 ekor di antara bin-biri tersebut mengalami abortus. Jadi, dan 15 ekor bin-biri yang diinfeksi, dalam waktu 13 hari p.i., total 11 ekor atau 73,3% di antaranya mengalami abortus. Pada akhir pengamatan, 3 ekor induk biri-biri melahirkan anak-anaknya dengan normal, dan 1 ekor sisanya tidak melahirkan anak (resorpsi sempurna). Antibodi spesifik terhadap *Toxoplasma*, ditemukan pada 8 ekor diantara 15 ekor bin-biri (53,33%) pada hari ke 13 p.i., tetapi pada pemeriksaan hari ke 21 p.i. semua bin-biri yang diinfeksi menunjukkan hasil positif (100%). Yang menarik adalah pada pemeriksaan PCR dari 11 jaringan plasenta bin-biri yang mengalami abortus, ternyata tidak satupun di antara sampel jaringan yang positif mengandung DNA *Toxoplasma*. Hasil pemeriksaan PCR jaringan plasenta dan 3 bin-biri yang melahirkan anak, semuanya positif. Hasil inokulasi pada mencit dengan ekstrak jaringan plasenta bin-biri yang melahirkan anak semuanya positif; tetapi inokulasi dengan ekstrak jaringan abortus, semuanya negatif (Owen, 1998a; Owen, 1998b). Hal ini membuktikan bahwa pada infeksi *Toxoplasma* memang ada infiltrasi parasit ke jaringan plasenta, tetapi dampak pada buah kehamilan telah terjadi sebelum parasit tersebut mencapai jaringan plasenta.

Penelitian pada manusia yang dilakukan di Malang, menunjukkan bahwa prevalensi zat anti IgG toxoplasma pada 54 wanita hamil yang melahirkan bayi cacat di 6 rumah sakit di kota Malang adalah 57,6% dan pada 43 wanita mengalami abortus di RS dr Saiful Anwar adalah 53,48%. Prevalensi IgG pada wanita hamil normal adalah 60,86% (Sardjono, 2000. Sardjono, 2002a.). Hal ini mengisyaratkan bahwa prevalensi toksoplasmosis pada populasi umum di Malang cukup tinggi. Namun, pada pemeriksaan PCR terhadap 99 sampel jaringan plasenta yang berasal dari 54 bayi lahir cacat dan 45 bayi lahir normal, tidak ditemukan DNA *Toxoplasma*. Hasil pemeriksaan PCR pada 43 sampel jaringan

kerokan jaringan sisa kehamilan pada kasus-kasus abortus spontan tersebut ternyata juga negatif (Sardjono, 2000; Sardjono, 2002a.).

Penelitian lain yang dilakukan oleh Fricker-Hidalgo, (1998) menyebutkan bahwa pada pemeriksaan PCR 94 sampel jaringan plasenta yang berasal dari bayi lahir cacat, hanya 3 sampel (3,2%) yang menunjukkan hasil positif. Penelitian yang dilakukan di Manado, memperoleh hasil yaitu 5 dari 30 sampel darah (16,66%) dan 9 dari 30 sampel kerokan jaringan abortus (30,0%) menunjukkan hasil PCR positif (Suryawan, 2003). Hasil-hasil penelitian tersebut menunjukkan bahwa pada kejadian kegagalan kehamilan dengan status serologis *Toxoplasma* positif, kehadiran parasit di jaringan plasenta ternyata relatif jarang. Hal ini memperkuat dugaan bahwa gangguan kehamilan tidak ditentukan oleh kehadiran parasit di jaringan plasenta. Atas dasar berbagai laporan penelitian tersebut dapat disimpulkan bahwa peningkatan jumlah takhizoit memang dapat berpengaruh terhadap hasil kehamilan, tetapi tidak secara langsung.

Ada hal lain yang menarik untuk dikaji dari perbedaan hasil penelitian Sardjono (2002a) di Malang dan Suryawan (2003) di Manado. Kedua peneliti tersebut mempelajari hal yang sama, yaitu deteksi DNA *Toxoplasma gondii* pada jaringan sisa abortus dengan metoda PCR, dan mencari hubungannya dengan peristiwa abortus. Metoda yang dilakukan oleh Sardjono (2002a) adalah *single PCR* dengan menggunakan sepasang *primer* dengan urutan basa masing-masing adalah: 5'AAC GGG CGA GTA GCA CCT GAG GAGA-3', dan 5'TGG GTC TAC GTC GAT GGC ATG ACA AC-3'. Walaupun sumuran yang berisi DNA sampel tidak ada yang positif, tetapi *primer* tersebut menghasilkan pita pada sumuran yang berisi DNA dari *Toxoplasma gondii* galur RH (kontrol positif) pada 194 bp. (Sardjono, 2002a) Suryawan et.al (2003) menggunakan metoda *nested-*

PCR, dengan dua pasang *primer*. Pasangan yang pertama yaitu 5'-CCA TGC ATG TCT AAG TAT AAGC-3' dan 5'-GTT ACC CGT CACTGCCAC-3', yang menghasilkan pita pada 311 bp, dan pasangan *primer* 5'-CTA AGT ATA AGC TTT TAT ACG GC-3' dan 5'-TGC CAC GGT AGT CCA ATA C-3' menghasilkan pita pada 290 bp. Kedua peneliti tersebut sama-sama tidak melakukan inokulasi ekstrak jaringan pada mencit. Karena PCR bersifat sangat spesifik sehingga relatif kurang sensitif, maka dan hasil kedua penelitian yang berbeda tempat dan metoda tersebut dapat diambil beberapa kesimpulan. Pertama, ibu-ibu yang mengalami abortus spontan tersebut memang mengalami infeksi *Toxoplasma* tetapi parasit yang menginfeksi bukan berasal dari galur RH. Kedua, adanya perbedaan galur *Toxoplasma gondii* yang menginfeksi ibu-ibu hamil di Malang dan di Manado perlu dipertimbangkan. Kedua penelitian yang dilakukan di Malang maupun Manado tersebut juga ikut memperkuat dugaan bahwa kegagalan kehamilan akibat infeksi *Toxoplasma* lebih dipengaruhi oleh mekanisme tidak langsung dibandingkan oleh mekanisme langsung dan parasitnya. Untuk lebih memperkuat bukti bahwa kehadiran parasit di jaringan plasenta tidak mutlak diperlukan dalam patogenesis terjadinya abortus serta bentuk kegagalan kehamilan yang lain, dapat diusulkan pemeriksaan imunohistokimia dengan menggunakan antibodi *anti-Toxoplasma* yang bersangkutan.

6.2. Pengaruh infeksi *Toxoplasma* pada produksi IFN- γ plasma

Infeksi yang disebabkan oleh patogen ekstraseluler maupun intraseluler merangsang tubuh untuk menggunakan semua mekanisme yang dimilikinya guna mempertahankan diri terhadap bahaya yang ditimbulkan oleh patogen tersebut. Sistem kekebalan non spesifik selalu bereaksi terlebih dahulu, sesuai dengan

fungsinya sebagai pertahanan terdepan dalam menghadapi serangan berbagai mikroorganisme patogen. Sebaliknya sistem kekebalan spesifik masih memerlukan waktu untuk mengenal antigen terlebih dahulu sebelum memberikan responnya. Kedua sistem kekebalan tersebut melibatkan berbagai komponen humoral yang meliputi berbagai jenis komplemen, interferon, CRP dan antibodi. Sistem kekebalan juga melibatkan komponen seluler yaitu makrofag, monosit, PMN, NK dan berbagai subset sel limfosit T. Kedua komponen tersebut selalu bekerja sama dengan erat dan tidak dapat dipisahkan antara yang satu dengan yang lain (Sitas, 1997, Baratawidjaja, 2002; Lewis, 2004).

Infeksi *Toxoplasma gondii* memicu respon kekebalan tubuh yang bersifat non spesifik maupun yang spesifik tanpa tergantung pada galur parasitnya dan di mana parasit tersebut berada di dalam tubuh hospes. Respon tersebut antara lain berupa sekresi berbagai jenis sitokin (Hunter, 1994a). Sekresi berbagai jenis *chemokine* oleh sel-sel tubuh termasuk sitokin-sitokin pro-inflamasi, merupakan hal yang penting sebagai respon hospes terhadap infeksi *Toxoplasma gondii*. Toksoplasmosis akut menyebabkan sel-sel hospes yang diinfeksi mengalami lisis diikuti infiltrasi sel-sel radang yang terdiri dari limfosit, makrofag dan neutrofil. Diperoleh bukti bahwa setelah infeksi, terjadi pengeluaran sitokin-sitokin pro-inflamasi oleh sel yang terinfeksi *Toxoplasma* (Denney, 1999). Produksi sitokin bukan merupakan dampak langsung dari adanya infeksi, tetapi terjadi melalui teraktivasinya sel-sel makrofag, NK dan limfosit. Berbagai kajian menunjukkan bahwa sel-sel dendritik, neutrofil dan makrofag bereaksi langsung terhadap antigen parasit dengan memproduksi IL-12, TNF α dan IFN γ . Imunitas yang terjadi akhirnya akan terpola menurut kadar dan keseimbangan sitokin yang diproduksi tersebut (Bliss, 1999; Denney, 1999; Mordue, 2001)

6.2.1. Pengaruh agent, dosis dan lama infeksi pada produksi IFN γ

Peningkatan sekresi sitokin sebagai respon terhadap infeksi juga dijumpai pada infeksi oleh patogen-patogen yang bersifat *invasive* selain *Toxoplasma gondii*, seperti *enteroinvasive bacteria*, *Entamoeba histolytica*, *Cryptosporidium parvum* dan *Chlamydia spp.* (Denney, 1999). IFN- γ dikatakan sebagai mediator utama dan sistem kekebalan tubuh terhadap infeksi *Toxoplasma* (Suzuki, 1988; Lüder, 2002), namun beberapa penulis menyebutkan adanya perbedaan faktor yang saling berpengaruh dalam produksi IFN- γ tersebut (Bliss, 1999; Mordue, 2001). Pada infeksi *Toxoplasma*, sel-sel neutrofil terpicu untuk memproduksi IL-12 pada kadar yang tinggi dan TNF α pada kadar yang rendah, tetapi bermakna. Kedua sitokin tersebut diproduksi dalam kondisi tanpa IFN- γ . Hal ini menunjukkan bahwa neutrofil memiliki kemampuan untuk memproduksi sitokin-sitokin imunoregulator yang penting sebagai pertahanan lini pertama dan merangsang kekebalan yang dimediasi oleh sel terhadap parasit (Bliss, 1999).

Pada penelitian ini nampak bahwa pada infeksi *Toxoplasma gondii* galur RH, kadar IFN- γ plasma meningkat sesuai dengan lama dan dosis infeksi (Tabel 5.6. dan Gambar 5.6.). Peningkatan kadar IFN- γ plasma tersebut ketika diukur pada H12 belum bermakna ($p=0,266$; ANOVA) dan baru bermakna setelah infeksi berlangsung lebih lama yaitu H15-16 ($p= 0,00$; ANOVA). Pada H15-16 dijumpai adanya perbedaan bermakna antara kelompok kontrol dengan kelompok dosis 10 ($p =0,046$, *Post Hoc*) dan kelompok dosis 50 maupun 100 ($p=0,00$; *Post Hoc*). Kelompok dosis 10 juga berbeda dengan kelompok dosis 50 dan 100 ($p=0,008$; *Post Hoc*), tetapi antara kelompok dosis 50 dan 100 sendiri perbedaannya tidak bermakna bahkan kadar rata-rata IFN- γ plasma pada kelompok dosis 50 takhizoit

($3,2118 \pm 0,1255$ ng/ml) lebih tinggi dibandingkan kelompok dosis 100 takhizoit ($3,0806 \pm 0,2439$ ng/ml) ($p = 0,992$; *Post Hoc*).

Pada analisis jalur (Gambar 5.10) nampak bahwa kenaikan jumlah takhizoit meningkatkan kadar IFN- γ dalam plasma (0,647; $p = 0,00$). Pengaruh lama infeksi terhadap kenaikan kadar IFN- γ plasma cukup bermakna (0,288; $p = 0,01$), tetapi pengaruh dosis infeksi terhadap kenaikan kadar IFN- γ plasma tidak bermakna (0,023; $p = 0,824$). Kondisi ini sesuai dengan fenomena-fenomena lain yang ditemukan pada penelitian ini. Peningkatan jumlah takhizoit dalam cairan peritoneum dan penurunan jumlah janin, keduanya berubah secara bermakna seiring dengan lamanya infeksi. Keadaan ini sesuai dengan kaidah hubungan hospes-parasit, di mana produksi sitokin dalam jumlah yang banyak juga terkait dengan jumlah parasit di dalam tubuh (*parasite burden*). Hasil ini menunjukkan bahwa dalam kurun waktu tertentu infeksi *Toxoplasma gondii* galur RH pada mencit BALB/c meningkatkan kadar IFN- γ plasma dalam jumlah tertentu pula. Sampai dengan H4 p.i. peningkatan produksi IFN- γ tersebut belum bermakna, sebarangpun dosis yang diberikan ($p > 0,05$). Produksi IFN- γ yang meningkat dan mungkin maksimal dijumpai pada H6-7 p.i. ($p < 0,05$). Hasil analisis jalur yang menunjukkan bahwa pengaruh jumlah takhizoit terhadap kadar IFN- γ sebesar 0,647; $p = 0,00$ mengisyaratkan bahwa selain infeksi *Toxoplasma gondii* sendiri, masih ada faktor lain yang menyebabkan peningkatan kadar IFN- γ plasma.

Infeksi oleh *Toxoplasma gondii* dari galur yang virulen maupun non virulen pada mencit galur BALB/c dan galur C57BL/6, terbukti meningkatkan produksi sitokin-sitokin Th1 dalam darah, termasuk IFN- γ dan TNF α di jaringan plasenta, paru dan limpa (Hunter, 1994a, Hunter, 1994b; Denney, 1999; Mordue, 2001).

Menurut He (1997), kadar IFN- γ dan TNF α pada mencit BALB/c yang diinfeksi *Toxoplasma gondii* pada usia kebuntingan satu minggu dan dibedah pada H4 p.i. lebih tinggi dibandingkan pada mencit C57BL/6, yang diinfeksi pada usia kebuntingan satu minggu dan dibedah pada H11 p.i. Hal ini berhubungan dengan jumlah parasit di jaringan plasenta dan paru mencit C57BL/6 yang lebih tinggi dibandingkan pada mencit BALB/c. Pada akhir kebuntingan, kadar IFN- γ dan TNF α tidak terlihat berkorelasi dengan jumlah parasit di jaringan paru dan plasenta. Hal ini menunjukkan bahwa pada awal kebuntingan, IFN- γ dan TNF α endogen justru berperan sangat penting dalam proses penghambatan pertumbuhan parasit *Toxoplasma gondii* di jaringan paru dan plasenta, tetapi tidak demikian halnya bila infeksi terjadi pada akhir kebuntingan. Mencit BALB/c lebih resisten karena lebih mampu memproduksi sitokin-sitokin Th1 yang dapat menghambat pertumbuhan parasit dibanding mencit C57BL/6 (He, 1997)

6.2.2. Infeksi *Toxoplasma gondii* galur RH memicu overproduksi IFN γ

Peningkatan produksi IFN- γ pada infeksi *Toxoplasma* selain ditentukan oleh galur parasit yang menginfeksi, juga oleh galur hospes dan kemampuannya untuk merespon infeksi tersebut. Infeksi akut yang disebabkan oleh parasit galur yang virulen/RH atau dosis letal dan galur non virulen/PIG, memicu produksi sitokin-sitokin Th1 yang bersifat pro-inflamasi seperti IFN- γ , TNF α , IL-12 dan IL-18. Infeksi oleh galur RH menimbulkan produksi sitokin yang berlebihan dan lebih banyak dibandingkan infeksi oleh galur yang non-virulen (PIG) baik pada hospes yang resisten (mencit BALB/c) maupun pada hospes yang kurang resisten (mencit C57BL/6) (He, 1997; Mordue, 2001). Pada mencit yang *IL-10 deficient* dan diinokulasi dengan *Toxoplasma gondii* galur yang avirulen, terjadi kematian

pada dua minggu pertama pasca infeksi, yang disebabkan karena peningkatan IFN- γ , TNF α dan IL-12 secara sistemik. Kadar IL-12 dan IFN γ pada serum mencit yang *IL-10 deficient* dan diinfeksi *Toxoplasma gondii* atau *Trypanozoma cruzi* tersebut, didapatkan empat sampai enam kali lebih tinggi dibanding pada serum mencit kontrol (Wynn and Kwiatkowski, 2004).

Overproduksi sitokin-sitokin Th1 yang menyebabkan kematian mencit pada infeksi *Toxoplasma* akut oleh galur yang virulen, diidentikkan dengan infeksi sistemik yang disebabkan oleh bakteri Gram negatif. Pada kedua hal tersebut sama-sama terjadi peningkatan kadar IL-1 β , TNF α , dan IL-18 (Mordue, 2001). Fungsi IL-18 berhubungan dengan IL-1 dan bekerja sama dengan IL-12, termasuk dalam hal induksi IFN- γ dan peningkatan respon Th1 (Akira, 2000). Namun, *Toxoplasma gondii* berbeda dengan bakteri Gram negatif dalam beberapa hal yang penting. Pertama, *Toxoplasma gondii* secara struktural tidak mengandung LPS seperti bakteri Gram negatif, sehingga respon kekebalan alami terhadap parasit ini tidak dimediasi oleh *Toll-like receptor 4*, yaitu pola pengenalan reseptor klasik yang terjadi pada bakteri yang mengandung LPS (Abbas, 2000). Kedua, pada toksoplasmosis akut produksi IFN- γ yang diperlukan untuk mengontrol infeksi sangat dipengaruhi oleh IL-12, dan sedikit sekali dipengaruhi oleh IL-18. Ketiga, pada infeksi bakteri, endotoksemia memicu terjadinya kerusakan liver yang berhubungan khusus dengan apoptosis yang dimediasi oleh Fas dan TNFR, (*Caspase-1-independent Fas-Fas ligand-mediated IL-18 secretion*) sedangkan kerusakan liver pada toksoplasmosis tidak tergantung pada faktor-faktor tersebut (Mordue, 2001). Hal ini mengisyaratkan bahwa walaupun patogenesis yang terjadi menyerupai infeksi bakteri Gram negatif, namun pada infeksi *Toxoplasma*

khususnya galur yang virulen, ada mekanisme patogenesis tersendiri yang belum diketahui. Ternyata diketahui bahwa infeksi *Toxoplasma gondii* galur virulen dapat menyebabkan kematian mencit tanpa dipengaruhi oleh dosis infeksi dan genus hospes (Sibley and Howe, 1996; Mordue, 2001)

Sejak tahun 1995 semakin jelas diketahui bahwa pada infeksi patogen intraseluler perkembangan sel-sel ke arah dominasi Th1 atau Th2 diatur oleh respon kekebalan alami di luar tempat infeksi. Infeksi *Toxoplasma gondii* dapat dibandingkan dengan infeksi patogen intraseluler seperti *Listeria monocytogenes*, di mana IFN- γ merupakan mediator utama dalam mekanisme imunopatologi terhadap infeksi. Sitokin IL-12 dan IL-4 masing-masing telah diketahui berperan sebagai pemicu utama dan respon Th1 dan Th2. Bila sekresi IL-12 terstimulasi produksi IL-4 menurun dan respon Th1 dominan, dan bila IL-4 meningkat, maka sel-sel Th2 berkembang. Karena *Listeria monocytogenes* adalah pemicu IL-12 yang kuat, maka sel-sel Th1 yang dipengaruhi oleh IFN- γ bisa teraktivasi secara mencolok (Kaufmann, 1995). Pada mencit yang diinfeksi *Toxoplasma gondii* galur type II terjadi produksi sitokin-sitokin Th1 yang berperan mengontrol infeksi. Sebaliknya, pada infeksi galur RH terjadi overproduksi IFN- γ yang menimbulkan kerusakan jaringan organ-organ vital (Sibley and Howe, 1996; Mordue, 2001).

Pada penelitian ini didapatkan peningkatan kadar IFN γ yang bermakna pada H15-16, atau 6-7 hari p.i (Tabel 5.6.) pada kelompok dosis 10 takhizoit lebih dan lima kali lipat ($p = 0,046$); dan pada kelompok dosis 50 dan 100 takhizoit hampir sepuluh kali lipat dibanding kelompok kontrol ($p = 0,000$). Kadar IFN γ pada kelompok dosis 50 bahkan lebih tinggi dibanding kelompok dosis 100 takhizoit. Hal ini mengisyaratkan adanya keterbatasan kemampuan dan keseimbangan

antara produksi sitokin yang dipengaruhi oleh jumlah parasit dan kadar IFN γ sistemik, dengan viabilitas sel-sel jaringan tubuh. Sampai dosis tertentu, peningkatan kadar IFN γ mungkin masih efisien karena mampu melindungi hospes terhadap akibat yang lebih fatal. Sebaliknya, peningkatan kadar IFN γ yang berlebihan dan melewati batas maksimal justru merugikan dan dapat berakibat fatal. Peningkatan kadar sitokin yang berlebihan pada infeksi *Toxoplasma gondii* galur RH inilah yang pada penelitian ini diperkirakan sebagai salah satu penyebab tidak langsung yang mendasari terjadinya kegagalan kehamilan akibat infeksi *Toxoplasma*. Hal ini memerlukan penjelasan dan penelitian lebih lanjut.

6.3. Kadar sitokin IFN- γ , infeksi *Toxoplasma* dan kehamilan

Keseimbangan kadar dan produksi berbagai jenis sitokin diyakini sangat berperan pada seluruh tahap kehamilan, sejak tahap implantasi sampai dengan persalinan (Carp, 2004). Banyak buku yang mendukung pendapat bahwa sitokin memegang peran kunci dalam mempertahankan kehamilan melalui modulasi sistem imun dan sel-sel yang berhubungan dengannya (Saito, 2000). Pada tahap awal kehamilan, janin dan jaringan plasenta memproduksi berbagai macam sitokin, termasuk interferon (IFN), interleukin (IL), *tumor necrosis factor* (TNF), dan *granulocyte macrophage colony-stimulating factors* (GM-CSF). Berbagai sitokin tersebut diyakini berfungsi untuk modulasi sistem imun supaya janin tidak ditolak oleh sistem imun ibu, namun bagaimana mekanisme kerja masing-masing sitokin tersebut belum sepenuhnya diketahui (Schafer-Somi, 2003).

Pada keadaan normal, kehamilan melibatkan pergantian (*switching*) antara sitokin Th1-ke-Th2 yang terjadi pada saat-saat yang tepat. Peran Th1 sangat diperlukan pada awal kehamilan, yaitu untuk proses invasi sel trofoblas dan

angiogenesis pada tahap implantasi. Pada kehamilan normal, pergeseran dominasi dari Th-1 ke Th-2 terjadi segera setelah implantasi. Dalam hal-hal tertentu respon sel Th1 masih diperlukan untuk perlindungan ibu dan janin dari patogen, sehingga dapat terjadi perubahan sistemik pada sistem Th2 supaya tidak sepenuhnya menekan respon Th1 (Guilbert, 1996) Chauvat *et al.*, (2002) dan beberapa penulis lain menengarai bahwa selain sistem Th1 dan Th2, ada sitokin-sitokin atau mediator-mediator lain yang juga penting dalam mempertahankan kehamilan. Mereka meneliti 11 dan 18 jenis interleukin dan menemukan bahwa setiap interleukin tersebut muncul pada waktu tertentu dan menyediakan fungsi regulasi selama kehamilan. Ternyata sel-sel Th2 dan produksi IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, dan IL-13 sangat penting dalam mempertahankan kehamilan (Guilbert, 1996; Vince, 1996; Saito, 2000; Thellin, 2000; Das, 2002. Chauvat, 2002).

Infeksi patogen intraseluler seperti *Toxoplasma gondii* yang terjadi pada kehamilan, menimbulkan kondisi yang sulit dan dilematis. Hal ini karena bila dalam keadaan tersebut hospes harus melawan infeksi intraseluler melalui respon Th-1, akan membahayakan kehamilannya; tetapi bila hospes harus memelihara kehamilan dengan mempertahankan pengaruh Th-2, berarti parasit seolah-olah dibenarkan peluang untuk terus berkembang di dalam tubuh hospes. Teori imunotropik dan Wegman *et al.*, (1993) mengatakan bahwa sitokin-sitokin Th1 (IL2, TNF α dan IFN γ) secara sistemik berpengaruh negatif terhadap kehamilan, baik secara langsung terhadap kehidupan dan fungsi trofoblas atau secara tidak langsung mengaktifasi efektor kekebalan yang diperantarai oleh sel (CMI). Pengaruh ini dihubungkan dengan ekspresi lokal dari sitokin-sitokin Th2 seperti IL-3, IL-4, IL-6, IL-10. Kondisi ini sangat menguntungkan, karena dengan hal itu pada kehamilan

normal, respon Th-2 tidak mudah beralih ke Th-1, tetapi justru respon Th-1 yang lebih mudah beralih ke Th-2 (Wegman *et al*., 1993; Ragupathy, 1997). Bonney (2001) menyebutkan pentingnya peran IL-4 dalam mempertahankan kehamilan, yaitu bahwa IL-4 bekerja menekan respon Th1 dengan menghambat produksi IL-12 oleh makrofag dan sel-sel dendritik (Gambar 2.2.4. dan Gambar 3.1.).

Selain hal-hal yang telah disebutkan di atas, masih ada beberapa faktor atau mediator lain yang ikut menentukan keberhasilan dan kegagalan kehamilan. Faktor-faktor tersebut antara lain *Leukaemia Inhibitory Factor* (LIF), makrofag dan sel NK, HLA-G, kadar hormon progesteron, aktivitas beberapa komplemen dan produksi berbagai jenis antibodi penghambat (*blocking antibodies*), serta keseimbangan proses apoptosis sel-sel plasenta (Norwitz, 2001, Lewis, 2004). LIF disintesa dan disekresi oleh endometrium dan sel-sel stroma dan reseptornya sangat penting untuk implantasi, diferensiasi, dan pertumbuhan sel-sel trofoblas (Theillin, 2000). mRNA LIF juga ditemukan pada sel NK desidua dan sel T, terutama subset Th2 (Piccinni, 2001). Hormon progesteron, sitokin IL-1, dan IL-4 diketahui berfungsi untuk *up-regulation* produksi LIF melalui sel-sel endometrium, sementara *down-regulation* dilakukan oleh IL-12 dan IFN- γ , yaitu sitokin yang menginduksi sel Th1 (Jenkins, 2000, Schafer-Somi, 2003)

6.3.1. Peran sel NK dan makrofag dalam produksi IFN γ pada kehamilan

Ketika sel T dan sel B hampir tidak ditemukan pada uterus hamil, terdapat sekelompok khusus dan sel NK yang disebut *uterine natural killer* (uNK), yang bersama makrofag berperan penting dalam mempertahankan kehamilan (Saito, 2000; Ain, 2003, Mor and Abrahams, 2003). Sel uNK yang hanya ditemukan di uterus melakukan mekanisme membunuh yang sangat terbatas (Ain, 2003) dan

mengalami transformasi selama kehamilan berlangsung. Selama kehamilan, mereka menunjukkan hilangnya aktivitas sitolitik dan meningkatnya produksi molekul-molekul efektor (Hunt, 2000). Sel uNK mengisi sebagian besar populasi limfosit di tempat implantasi, yaitu sekitar 30-90% dari seluruh sel yang ada selama trimester pertama kehamilan manusia (Hunt, 2000; Luppi, 2003). Sel ini memproduksi sitokin yang dibutuhkan untuk proses implantasi sel trofoblas pada awal kehamilan, yaitu IFN- γ (Croy, 2002). Setelah implantasi, sel ini diduga berperan dalam pembentukan pembuluh darah uterus, dan memasuki trimester kedua, populasi sel-sel ini berkurang drastis. Mekanisme yang sebenarnya tentang hal ini masih belum diketahui (Ain, 2003). Sel uNK juga berperan pada lapisan maternal-fetal untuk menjamin pertahanan terhadap serangan mikroorganisme, yang apabila menembus plasenta, dapat mengancam kelangsungan hidup janin (Luppi, 2003, Lewis, 2004).

Makrofag mempunyai peran penting sebagai imunoregulator pada kehamilan, karena selain mempunyai efek anti-inflamasi, makrofag mengisi sekitar 10-30% dan total populasi sel di jaringan plasenta. Tidak seperti sel-sel NK, populasi makrofag tidak menurun selama kehamilan berlangsung (Loke and King 1995; Hunt, 2000; Mor and Abrahams, 2003). Sel yang disebut sel-sel *Hofbauer* ini (Vince, 1996), bila teraktivasi akan memproduksi sitokin anti-inflamasi seperti IL-10. Tingkat produksi *cytotoxic free-oxygen species* akan sangat menurun jika dibandingkan dengan jumlah yang dihasilkan oleh makrofag dalam keadaan normal (Thelie, 2000). Sel-sel ini memproduksi sitokin-sitokin yang mendorong suasana ke arah tingkatan Th2 yang diperlukan untuk kelangsungan kehamilan (Lewis, 2004). Selama kehamilan normal, pembersihan terhadap sel-sel apoptotik menekan makrofag yang teraktivasi dalam hal produksi sitokin-sitokin proinflamasi

seperti $TNF\alpha$ dan $IFN\gamma$, dan meningkatkan produksi sitokin-sitokin $Th2$. Hal ini menguntungkan bagi pertumbuhan trofoblas (Mor and Abrahams, 2003).

Perubahan keseimbangan sitokin dalam darah dapat menjadi pemicu terjadinya penolakan janin oleh ibu. Secara imunologik, janin pada hakekatnya adalah benda asing yang hidup di dalam tubuh ibu hanya untuk sementara waktu. Pengetasan tentang mekanisme keberhasilan janin sebagai *allograft* yang diterima sementara oleh ibu, hanya sedikit yang sudah diketahui; sedang sebagian besar masih merupakan misteri yang terus dipelajari. Postulat tentang penolakan janin secara imunologik yang disebabkan karena pengenalan antigen *paternal* oleh sistem imun *maternal*, menghasilkan sel-sel imun yang abnormal dan produksi sitokin, pernah diajukan sebagai salah satu sebab terjadinya kegagalan kehamilan yang tidak diketahui sebabnya. Kondisi ini terbukti terjadi pada rodentia, tetapi faktanya jarang dijumpai pada manusia (Laird, 2003).

Pada infeksi *Toxoplasma*, sebelum parasit mencapai jaringan plasenta, telah terjadi peningkatan kadar $IFN\gamma$ secara sistemik. Sebenarnya sel-sel uNK memiliki kemampuan melawan mikroorganisme yang melewati batas fetal-maternal (Luppi, 2003, Lewis 2004), namun bila infeksi ini terjadi pasca implantasi, di mana populasi sel-sel uNK sudah sangat menurun, maka pada keadaan ini peranan sel-sel makrofag menjadi lebih dominan. Kondisi ini mirip dengan kehamilan yang mengalami komplikasi preeklamsi atau *IUGR*. Pada preeklamsi sel-sel makrofag tidak berada di dalam stroma endometrium, tetapi berada di dalam dan sekitar arteria spiralis (Gambar 2.3.5), dan bila teraktivasi mengeluarkan sitokin-sitokin pro-inflamasi seperti $TNF\alpha$ dan $IFN\gamma$ dan menyebabkan apoptosis sel-sel trofoblas ekstravilous (Mor and Abrahams, 2003). Peningkatan kadar $IFN\gamma$ sistemik akan

menyebabkan sel-sel makrofag teraktivasi dan membuat kadar IFN γ di tempat implantasi semakin meningkat dan meningkatkan apoptosis sel-sel trofoblas.

Pada penelitian ini nampak bahwa peningkatan kadar IFN γ meningkatkan apoptosis sel-sel desidua melalui peningkatan aktivitas caspase 3 (Gambar 5.10).

6.3.2. Pengaruh peningkatan IFN γ plasma terhadap hasil kehamilan

Berbagai patogen intraseluler seperti *Toxoplasma gondii* dan *Listeria monocytogenes* memicu kekebalan seluler (*Cell Mediated Immunity* = CMI) dengan merangsang sel-sel dendritik dan/atau makrofag untuk memproduksi sitokin IL-12. Hal ini kemudian memicu produksi IFN γ oleh sel-sel NK dan T, dan sel-sel APC yang distimulasi IFN γ untuk mengeluarkan IL-12 lebih banyak melalui rangkaian *positive feedback*. Rangkaian mekanisme ini memicu perkembangan dan aktivasi limfosit Th1 ke arah mekanisme efektor anti-mikrobal yang penting dan mendasar (Kaufmann, 1995). Kontrol terhadap infeksi berbagai patogen intraseluler seperti *Toxoplasma gondii*, *Listeria monocytogenes* dan *Trypanosoma cruzi* membutuhkan aktivasi yang terkoordinasi antara sel-sel yang spesifik terhadap antigen (limfosit T) dan sel-sel yang non spesifik (sel NK, netrofil dan makrofag), melalui peran IFN γ dan TNF α dalam pengaturan aktivasi makrofag dan produksi *nitric oxide* (Wynn and Kwiatkowski, 2004)

Limfosit T adalah komponen sistem kekebalan yang bertugas mengenali dan menghancurkan benda asing melalui aktivitas sitotoksik dan aktivasi tipe sel dan molekul yang lain. Sel-sel ini berdiferensiasi menjadi dua macam subset yang mampu menghasilkan sitokin tertentu dan melaksanakan respon imun spesifik. Sel Th1 berhubungan dengan reaksi hipersensitifitas tipe lambat dan fungsi sel T sitotoksik, sedangkan sel Th2 terlibat dalam respon antibodi (Saito, 2000). Pada

infeksi akut ekspresi sitokin-sitokin Th1 meningkat, sesuai dengan fungsinya sebagai mediator kekebalan non spesifik. IFN γ adalah salah satu sitokin dari subset Th1 yang dihasilkan oleh berbagai sel tubuh berinti (Stites, 1997, Saito, 2000), dan dilepas sebagai respon terhadap infeksi akut yang disebabkan oleh virus atau patogen lain (Stites, 1997, Baratawidjaja, 2002), termasuk *Toxoplasma gondii* (Hunter 1994a; Denney, 1999). IFN γ juga merupakan aktivator makrofag yang merangsang ekspresi MHC-I dan MHC-II serta proliferasi dan diferensiasi sel B, meningkatkan aktivitas sel NK, bersifat anti virus, meningkatkan ekspresi reseptor IL-2 dan sebagainya (Stites, 1997, Baratawidjaja, 2002)

Pada umumnya sitokin bekerja secara lokal dan melaksanakan fungsi autokrin dan parakrin, namun di antaranya ada beberapa yang masuk ke sirkulasi darah dan melaksanakan fungsi endokrin. Adanya sifat pleiotropi (efek biologis berbeda pada sel yang berbeda), redundansi (sitokin berbeda yang mempunyai efek mirip), sinergi (gabungan efek dari dua sitokin lebih besar daripada efek yang dihasilkan satu macam sitokin), dan antagonisme (satu sitokin menghambat kerja sitokin yang lain) menyebabkan sitokin dapat menimbulkan beberapa perubahan biologik (Kuby, 1994). Peningkatan produksi IFN γ akibat infeksi *Toxoplasma* dan faktor-faktor lain yang menyertainya, baik oleh sistem kekebalan tubuh alami maupun sel-sel makrofag dan uNK yang khusus berada di jaringan fetomaternal, akan menentukan kehamilan dapat berlangsung terus atautkah terhenti.

Dan analisis jalur pada penelitian ini terlihat bahwa peningkatan kadar IFN γ plasma berpengaruh langsung pada hasil kebuntingan mencit (-0,377, p=0,002). Peningkatan kadar IFN γ plasma sebagai respon terhadap infeksi akut pada penelitian ini terbukti dipengaruhi oleh jumlah tachizoit (0,647; p=0,00), namun

peningkatan kadar IFN γ ini bukan secara langsung disebabkan oleh parasitnya, melainkan merupakan hasil kerja dari sistem kekebalan nonspesifik, yaitu berupa teraktivasinya makrofag, sel-sel NK dan limfosit (Bliss 1999; Denney, 1999; Mordue 2001). Dengan demikian maka dalam kondisi ditematis akibat infeksi *Toxoplasma gondii* pada kehamilan (khususnya oleh galur RH), kemungkinan terjadinya gangguan kehamilan akibat peningkatan kadar IFN γ plasma dengan berbagai manifestasi, hanya 37,7%. Dengan kata lain sekitar 62,2% kehamilan masih bisa tetap berlangsung sampai janin aterm dan siap untuk lahir ke dunia.

Salah satu manfaat yang dapat diambil dari hasil penelitian ini adalah, bahwa angka kejadian toksoplasmosis di masyarakat secara serologik cukup tinggi, dan hal ini cukup menimbulkan kegelisahan. Sejah ini, pemeriksaan serologik belum dapat membedakan galur *Toxoplasma gondii* yang menginfeksi tetapi masih merupakan sarana diagnostik toksoplasmosis yang paling sering dan praktis digunakan. Di sisi lain dampak patologik yang terjadi sangat dipengaruhi oleh galur dan tingkat virulensi dan lebih dari 70% dari kasus pada manusia dan hewan domestik bertubungan dengan galur dan tipe II yang non-virulen (Dupouy-Camet, 1997). Infeksi oleh galur yang non virulen menyebabkan peningkatan IFN γ , tetapi tidak se-excessive yang terjadi pada infeksi oleh galur RH, sehingga akibat yang terjadi lebih ringan. Dengan demikian maka dapat dipikirkan bahwa pada wanita hamil yang secara serologik terkena toksoplasmosis, pengukuran kadar IFN γ dapat dijadikan indikator prognosis kehamilan. Pada penderita yang pada pemeriksaan menunjukkan indikasi toksoplasmosis aktif yang ditandai dengan hasil IgG dan IgM positif, maka adanya peningkatan kadar IFN γ yang tinggi selama kehamilan, mengisyaratkan prognosis kehamilan yang kurang baik.

Hasil analisis jalur bahwa peningkatan IFN- γ akibat infeksi *Toxoplasma gondii* jalur RH menurunkan jumlah janin secara bermakna (-0,377; $p=0,002$), menunjukkan bahwa masih banyak hal dan mekanisme pada tingkat molekuler dan seluler yang terjadi tetapi belum dapat dijelaskan dari hasil penelitian ini. Di sisi lain, peningkatan kadar IFN- γ juga menyebabkan penurunan janin melalui jalur apoptosis sel-sel trofoblast yang didahului oleh peningkatan ekspresi aktivitas caspase-3 sel-sel trofoblas (0,361; $p=0,013$). Dari sini dapat disimpulkan bahwa kegagalan kehamilan sudah terjadi sebelum ada kenaikan kadar IFN- γ dan tanpa melalui jalur apoptosis yang dipengaruhi olehnya. Besar kemungkinan bahwa sitokin Th1 selain IFN- γ , misalnya TNF- α , IL-2, IL-12 (Gambar 2.2.4. dan Gambar 3.1.), atau mediator/sitokin yang lain dapat menurunkan jumlah janin melalui jalur tersendiri. Hal ini membuka peluang untuk pembuktian dan penelitian lebih lanjut.

6.4. Peningkatan kadar IFN- γ plasma, ekspresi caspase 3 dan apoptosis

6.4.1. Apoptosis dan mekanisme homeostasis pada kehamilan

Rahasia tentang berhasil atau gagalnya kehamilan serta pertumbuhan janin masih tetap bertumpu pada permasalahan, bagaimana telur yang telah dibuahi dapat tumbuh menjadi organisme multiseluler yang lengkap, terdiferensiasi dan berbagai jenis sel dan tersusun dengan sempurna. Selama proses perkembangan embrio, pada tingkat seluler diketahui bahwa organogenesis melibatkan berbagai proses yang terjadi secara simultan dan bersinambungan, yaitu pertumbuhan (proliferasi sel), morfogenesis (pembentukan organ premordium), diferensiasi (pertumbuhan sel sesuai dengan fungsinya), migrasi sel dan apoptosis (Kostovic-Knezevic, 2001). Apoptosis atau kematian sel yang terprogram adalah suatu proses yang kompleks, terkoordinasi dengan ketat dan menghemat tenaga, di mana sel-sel

secara individu mati tanpa mengganggu sel-sel di sekitarnya atau menimbulkan reaksi peradangan (Soini, 1998, Pizem and Cor, 2003). Proses ini merupakan mekanisme yang dilakukan oleh organisme untuk membuang sel-sel yang tidak berguna atau membahayakan dirinya, serta memelihara fungsi jaringan agar tetap normal (Cotran, 1999; Vermes, 1999). Apoptosis diperlukan untuk memelihara homeostasis dalam tubuh organisme multiseluler dan merupakan komponen penting dalam respon seluler terhadap rangsangan (Pizem and Cor, 2003).

Selama kehamilan, khususnya pada tahap implantasi, apoptosis diperlukan dalam proses *remodelling* jaringan desidua berkaitan dengan adanya janin yang sedang tumbuh (Joswig, 2003, Mor and Abrahams, 2003). Apoptosis juga dapat terjadi karena berbagai jenis stimulus fisik, penurunan hormon atau faktor pertumbuhan secara mendadak, interaksi antara reseptor-ligan (*Fas-FasL*, *TNF-TNFR*), atau sel-sel T sitotoksik yang mengaktifkan *caspase* (Cotran, 1999). Dan bidang molekuler, pada dasarnya apoptosis diatur oleh tiga gen, yaitu CED-3 dan CED-4 yang bersifat pro-apoptosis dan CED-9 yang bersifat anti-apoptosis (Soini, 1996; Aschkenazi, 1996; Hrgovic, 2000). Sekelompok enzim yang disebut *Caspases* (*Cysteine-aspartic acid proteases*), diketahui merupakan komponen utama yang berperan dalam rangkaian proses apoptosis (Ashkenazi, 1998; Thornberry, 1998). Dari 13 *caspase* yang telah diketahui peran masing-masing di dalam proses apoptosis, *caspases* yang tergolong *initiator* setelah teraktivasi dan berpasangan dengan sinyal-sinyal pro-apoptotik, segera pecah dan mengaktifasi *effector caspases* yang berada pada jalur di bawahnya dan di antaranya adalah *caspase* 3, 6 dan 7 (Gambar 2.3.3. dan 2.3.4) (Rowe and Chuang, 2004). Peningkatan kadar $IFN\gamma$ plasma yang berlebihan sebagai respon terhadap infeksi *Toxoplasma gondii*, dapat meningkatkan apoptosis melalui jalur ekstrinsik ini.

6.4.2. Peningkatan kadar $\text{IFN-}\gamma$ dan apoptosis sel-sel plasenta

Pada Tabel 5.6 dan Gambar 5.6 terlihat adanya peningkatan kadar $\text{IFN-}\gamma$ plasma yang bermakna, terutama pada periode 3 ($p=0,00$). Pada Tabel 5.7 juga terlihat adanya peningkatan ekspresi caspase 3 sel-sel trofoblas pada periode 3 yang cukup bermakna ($p = 0,047$). Pada Tabel 5.8.1 dan 5.8.2, peningkatan apoptosis hanya dijumpai pada sel-sel trofoblas periode 3, baik pada sediaan yang diwarnai dengan HF ($p = 0,087$) maupun dengan Kit *Apoptag* ($p = 0,032$). Pada analisis jalur (Gambar 5.10.) nampak bahwa peningkatan kadar $\text{IFN}\gamma$ secara langsung meningkatkan ekspresi aktivitas caspase 3 (0.359; $p = 0,001$), dan peningkatan ekspresi aktivitas caspase-3 juga meningkatkan apoptosis sel-sel trofoblas (0.962; $p = 0,000$). Apoptosis sel-sel trofoblas tidak dipengaruhi oleh peningkatan kadar $\text{IFN}\gamma$ ($-0,082$; $p = 0,232$).

Fakta yang ditemukan pada penelitian ini dapat dijelaskan sebagai berikut. Bahwa pada toksoplasmosis akut, terjadi produksi yang berlebihan dari $\text{IFN}\gamma$ yang disebabkan oleh virulensi *Toxoplasma gondii* yang tinggi (Gravilescu, 2001). Dikatakan bahwa $\text{IFN}\gamma$ termasuk *strong inducer of apoptosis* dan dapat mempengaruhi tingkat apoptosis sel-sel target (Shen, 2001) melalui jalur ekstrinsik. Terbentuknya *Fas-Fas ligand* atau *TNF-TNF receptor complex* yang berasal dari ikatan antara reseptor dengan protein adaptor yang mengandung *death domain* (FADD) akan mengaktifasi *effector caspases* termasuk caspase 3. Mekanisme tersebut telah ditunjukkan pada Gambar 2.3.3 dan 2.3.4. (Cotran, 1999; Budihardjo, 1999; Anonymous, 2003b; Rowe and Chuang, 2004). Hal tersebut di atas ternyata terbukti terjadi pada sel-sel trofoblas, dan tidak dijumpai pada sel-sel desidua. Dengan demikian disimpulkan bahwa sel-sel trofoblas

termasuk salah satu sel target, sehingga dengan peningkatan kadar IFN γ plasma derajat apoptosisnya juga meningkat.

Pada Tabel 5.7 tidak dijumpai peningkatan yang bermakna dari ekspresi caspase 3 pada sel-sel desidua, baik pada periode 2 ($p = 0,439$) maupun sampai pada periode 3 ($p = 0,616$). Pada Tabel 5.8.1 dan 5.8.2 juga tidak ditemukan peningkatan apoptosis sel-sel desidua yang bermakna pada seluruh kelompok dosis dibandingkan dengan kelompok kontrol, baik dengan pewarnaan HE pada periode 2 ($p = 0,974$) dan periode 3 ($p = 0,401$), maupun dengan pewarnaan Apoptag ($p = 0,079$ dan $0,584$). Pada analisis jalur, peningkatan kadar IFN γ plasma tidak meningkatkan ekspresi aktivitas caspase 3 ($-0,028$; $p = 0,854$) maupun indeks apoptosis sel-sel desidua ($0,057$, $p = 0,504$). Ekspresi aktivitas caspase-3 pada sel-sel desidua juga tidak berpengaruh bermakna terhadap apoptosis ($0,077$; $p = 0,395$). Dengan demikian peningkatan kadar IFN γ plasma meningkatkan apoptosis melalui aktivitas caspase -3 hanya terbukti terjadi pada sel-sel trofoblas. Asumsi bahwa peningkatan IFN γ plasma akan lebih berpengaruh terhadap sel-sel maternal dan pada sel-sel fetal, ternyata tidak terbukti.

6.5. Pengaruh apoptosis sel-sel plasenta pada hasil kehamilan

6.5.1. Apoptosis pada sel-sel trofoblas dan hasil kehamilan

Kehadiran makrofag di tempat implantasi sangat penting dalam hubungannya dengan mekanisme pertahanan janin, tidak hanya terhadap infeksi tetapi juga terhadap pengaturan imunitas feto-maternal. Kondisi lokal di tempat itu tidak hanya ditentukan oleh komposisi sel, tetapi juga oleh faktor-faktor terlarut yang ada di sana (Wegman, 1993). Sel-sel uNK yang merupakan produsen utama sitokin-sitokin Th1 yang diperlukan pada awal implantasi termasuk IFN γ , semula

mengisi sebagian besar stroma desidua, tetapi pada perkembangan kehamilan lebih lanjut populasinya kemudian menurun drastis (Hunt, 2000; Croy, 2002, Luppi, 2003). Selanjutnya, pada kehamilan normal pertumbuhan sel-sel trofoblas serta faju dan keseimbangan apoptosisnya dikendalikan oleh makrofag. Makrofag, yang pada kehamilan normal berada di dalam stroma desidua di sekitar arteria spiralis dan trofoblas ekstravilus, dapat melakukan pembersihan terhadap sel-sel trofoblas yang apoptosis dengan efisien selama proses *remodelling*. Makrofag menginduksi ekspresi sitokin-sitokin anti inflamasi (IL-4, IL-6 dan IL-10), yang berdampak protektif dan menunjang kehidupan trofoblas (Loke and King, 1995; Mor and Abrahams, 2003).

Dalam kondisi abnormal, misalnya pada pre-eklamsi, UGR atau infeksi, sel-sel makrofag tidak lagi berada di dalam stroma desidua, tetapi berada di dalam dan sekitar arteria spiralis, terpisah dari trofoblas (Mor and Abrahams, 2003). Perubahan keseimbangan sitokin sistemik berpengaruh pada kondisi lingkungan lokal di tempat implantasi dan akibat hal tersebut menyebabkan fungsi makrofag dalam pembersihan badan-badan apoptotik menjadi tidak efisien. Sel-sel makrofag justru mensekresi sitokin-sitokin IL-12, TNF α dan IFN γ , sehingga mengubah lingkungan ke arah profil Th1 dan menurunkan ketahanan trofoblas terhadap *Fas-mediated apoptosis*, sehingga sel-sel trofoblas yang mengalami apoptosis semakin banyak (Mor and Abrahams, 2003).

Pada penelitian ini dijumpai peningkatan kadar IFN γ plasma pada kelompok mencit bunting yang diinokulasi, yang pada periode 3 mencapai lebih dari sepuluh kali lipat dibandingkan kadar IFN γ plasma pada kelompok kontrol. Peningkatan kadar IFN γ plasma ini menyebabkan peningkatan ekspresi aktivitas caspase 3

(0,359 $p = 0,001$), dan selanjutnya peningkatan ekspresi aktivitas caspase-3 juga meningkatkan apoptosis sel-sel trofoblas (0,962; $p = 0,000$). Peningkatan apoptosis sel-sel trofoblas terutama pada periode 3 cukup bermakna, baik dengan pewarnaan HE ($p = 0,87$) maupun Apoptag ($p = 0,032$). Dan analisis jalur pada Gambar 5.10 nampak bahwa peningkatan apoptosis sel-sel trofoblas menyebabkan penurunan jumlah janin atau berpengaruh terbalik dengan hasil kebuntingan (-0,718; $p = 0,000$). Dengan demikian hipotesis bahwa peningkatan IFNy akibat infeksi *Toxoplasma* memicu laju apoptosis sel-sel trofoblas melalui jalur ekstrinsik dengan mengaktifasi enzim caspase-3 kemudian menyebabkan kegagalan kehamilan, telah terbukti.

6.5.2. Apoptosis pada sel-sel desidua

Pada penelitian ini ternyata tidak ditemukan peningkatan apoptosis yang bermakna dari sel-sel desidua. Hal ini telah diuraikan pada bab 6.4.2. Ternyata pada analisis jalur, apoptosis sel-sel desidua juga tidak berpengaruh terhadap penurunan jumlah janin (0,014 $p = 0,809$). Dalam kaidah hubungan antara inang dan pejamu, secara teoritik sel-sel desidua yang berasal dari ibu (inang) lebih bertanggung jawab atas kehadiran dan kehidupan janin (pejamu). Di samping itu pada kasus infeksi *Toxoplasma*, yang bertindak sebagai inang adalah ibu/induk, sehingga selayaknya yang terpengaruh lebih dulu adalah ibu, namun ternyata penelitian ini tidak dapat menunjukkan peran inang tersebut. Pada penelitian ini ditemukan fakta bahwa terjadinya kegagalan kehamilan justru dimulai bukan dari pihak maternal atau sel-sel desidua, melainkan dari pihak fetal, yaitu berupa apoptosis sel-sel trofoblas. Hasil penelitian ini berbeda dengan pernyataan para peneliti terdahulu yang menyebutkan bahwa apoptosis sel-sel desidua juga ikut

berperan pada peristiwa berakhirnya kehamilan, baik pada kelahiran normal (Runic, 1998; Halperin, 2000; Thiet, 2000), maupun pada beberapa bentuk kegagatan kehamilan (Kokawa, 1998b; Halperin, 2000). Perbedaan ini cukup unik dan dapat menjadi topik yang menarik untuk dibuktikan, dibahas dan diteliti lebih lanjut

6.6. Beberapa hasil samping di luar hipotesis penelitian

6.6.1. Sel-sel eritrosit berinti pada jaringan plasenta

Pada Gambar 5.7 dan Gambar 5.8. terlihat adanya sel-sel eritrosit yang berinti pada inisan jaringan plasenta, yang oleh peneliti dijadikan pedoman untuk mengenali daerah fetal. Telah disebutkan bahwa jenis plasenta mencit adalah *discoid-haemochorial* seperti pada manusia (Rennie, 1982; Loke and King, 1995), tetapi struktur hubungan antara komponen trofoblas dan desidua, tidak dalam bentuk villi-villi, melainkan berada dalam struktur yang disebut *labyrinth* (Benirschke, 2002). *Labyrinth* menyusun bagian terbesar dari lempeng plasenta, mengandung kapiler-kapiler janin yang sangat tipis, yang diperkuat oleh sejumlah kecil jaringan ikat. Mereka dikelilingi oleh trofoblas, dan berada di dalam sinusoid darah induk, dan di daerah inilah terjadi pertukaran antara fetal dan maternal (Benirschke, 2002)

Mengingat bahwa pada setiap kebuntingan seekor induk mencit dapat mengandung sepuluh anak atau lebih, dan masing-masing dihubungkan oleh satu plasenta, maka merupakan hal yang menarik untuk dikaji bagaimana seekor induk mencit dapat memelihara sekian banyak bayinya dalam waktu yang sama (Suzuki, 1997) Untuk mengetahui struktur dan efisiensi fungsi plasenta, Suzuki (1997) telah melakukan pengamatan secara histologi terutama mengenai

pembentukan *labyrinth* selama kebuntingan berlangsung. Pada pengamatan sediaan irisan jaringan plasenta mencit pada H12 dengan mikroskop cahaya biasa, komponen fetal dapat dikenali atas dasar ditemukannya sel-sel eritrosit fetal yang masih berinti dan sel-sel endotel. Sel-sel trofoblas dikenali dari intinya yang besar dan jelas, dan sebagian mengalami mitosis. Pada sediaan irisan jaringan plasenta mencit pada H18, komponen pembuluh darah fetal hanya dapat dikenali dari sel-sel endotel saja. Tidak lagi dijumpai sel-sel eritrosit yang berinti, dan trofoblas sulit dikenali karena selain dinding batas sel yang sangat tipis, populasinya sudah sangat menurun (Suzuki, 1997). Keberadaan sel-sel eritrosit berinti pada usia kebuntingan yang masih muda (H12) atau identik dengan periode-2 dari kebuntingan tersebut sangat penting, karena menunjukkan bahwa pada saat itu tingkat perkembangan fetus masih sederhana dan fungsi hematopoiesis masih dilakukan oleh *yolk-sac*. Pada usia kebuntingan yang sudah mendekati aterm (H18) sel-sel eritrosit berinti sudah berkurang bahkan hilang. Dasar ini dapat dijadikan pedoman pada penelitian ini bahwa daerah pengamatan tersebut adalah benar-benar daerah fetal. (Gambar 5.7. dan Gambar 5.8.)

6.6.2. Trombosis sebagai salah satu penyebab kegagalan kehamilan

Tabel 2.2.6. menunjukkan bahwa faktor infeksi hanya merupakan sebagian kecil dari berbagai kemungkinan penyebab abortus. Dan penelitian ini diperoleh hasil bahwa infeksi *Toxoplasma gondii* galur RH menyebabkan penurunan jumlah janin dengan koefisien jalur sebanyak 26,9%. Hal ini berarti bahwa masih banyak hal-hal lain di luar faktor infeksi khususnya infeksi *Toxoplasma*, yang dapat menyebabkan kegagalan kehamilan. Besarnya pengaruh semua variabel yang terlibat dalam seluruh sistem terhadap penurunan jumlah janin dalam sistem

analisis multifaktor ini adalah 86,2% (Gambar 5.10, Lampiran 10). Angka ini cukup besar dan bermakna, karena berarti penurunan jumlah janin yang terjadi karena faktor-faktor lain yang tidak terlibat dalam analisis pada penelitian ini hanya 13,8%

Aktir-akhir ini banyak dikemukakan bahwa mekanisme trombosis merupakan salah satu penyebab utama dari abortus (Tambunan *et al*, 2001), dan mungkin juga bentuk kegagalan kehamilan yang lain. Salah satu penyakit yang paling sering dihubungkan dengan trombosis tersebut adalah sindroma antiposfolipid antibodi (APL/APA). Sindroma antiposfolipid (APL) adalah suatu penyakit multisistem yang ditandai dengan gejala-gejala utama berupa trombosis arteri, abortus spontan berulang, kematian bayi dan ditemukannya antibodi terhadap antiposfolipid (Vinatier, 2001). Selain penulis yang tercantum pada Tabel 2.2.5, Tambunan *et al*, (2001) menyebutkan bahwa penyebab abortus berulang meliputi faktor kromosom (7%), gangguan hormonal (15%), anatomik (10-15%) dan kelainan pembekuan darah (*procoagulant defect* = 55%). Disebutkan bahwa patogenesis utama terjadinya abortus adalah trombosis yang menyebabkan infark plasenta. Hal ini diperkuat dengan bukti-bukti bahwa pemberian obat-obatan anti-trombotik seperti *Low Molecular Weight Heparin* (LMWH) atau dikombinasi dengan Aspirin kepada wanita hamil sebagai profilaksis ataupun pengobatan pendenta yang mempunyai riwayat abortus berulang, ternyata memberikan hasil berupa efek proteksi yang baik, yaitu sekitar 82% - 95,8% (Boda, 2001; Bombeli, 2001; Carmona, 2001; Tambunan, 2001)

Berkenaan dengan peran sitokin pada kehamilan, pada mulanya sitokin tidak dianggap sebagai penyebab, tetapi hanya merupakan sebagian dari mekanisme abortus. Pada kasus sindroma antiposfolipid, beberapa sitokin seperti TNF α dan IL-6 diduga juga ikut bertanggung jawab atas terjadinya trombosis dan kegagalan

kehamilan (Carp, 2004). Sejauh ini belum ada penelitian apakah infeksi *Toxoplasma gondii* juga berpengaruh pada fungsi pembekuan. Oleh karenanya masih terbuka kemungkinan untuk dilakukan penelitian apakah mekanisme terjadinya kegagalan kehamilan pada infeksi *Toxoplasma gondii*, selain melalui jalur sitokin seperti yang telah diuraikan di atas juga melalui gangguan fungsi pembekuan, seperti yang telah diketahui dalam kasus abortus berulang.

6.6.3. Metoda sinkronisasi oestrus alami pada mencit

Mencit galur BALB/c sering digunakan dalam berbagai penelitian di dunia kedokteran khususnya di bidang embriologi, antara lain karena mencit galur ini dikenal mempunyai tingkat kesuburan yang cukup tinggi. Namun demikian, untuk mendapatkan sejumlah mencit bunting dalam waktu yang bersamaan seperti pada penelitian ini, ternyata tidak mudah, sehingga diperlukan teknik tersendiri. Berbagai faktor penting yang juga berpengaruh terhadap keberhasilan kebuntingan mencit, antara lain meliputi jenis dan kemumian galur mencit, umur, gizi, lingkungan, paritas, sampai dengan teknik perkawinan.

Untuk mencit galur BALB/c, dengan pemeliharaan yang baik dan gizi yang cukup, pada usia 8 minggu berat badan rata-rata sudah mencapai 20 gram dan sudah menginjak dewasa serta siap untuk kawin. Pada setiap kebuntingan mencit dapat melahirkan janin antara 6-15 ekor, dan segera setelah melahirkan mereka mengalami oestrus (*post partum oestrus*), dan siap kawin lagi (Rugh, 1970; Daniels, 1978; Smith and Mangkoewidjojo, 1987). Bila mencit galur BALB/c dikawinkan secara monogami selama lima malam terus menerus, menghasilkan angka kopulasi yang ditandai dengan ditemukannya *vaginal plug*, pada malam pertama sebesar 80-90%, dan keberhasilan kebuntingan sekitar 40-70%. Pada

malam kedua, ketiga, keempat dan kelima rata-rata kopulasi hanya terjadi sekitar 2–5%. Pada perkawinan secara poligami, dengan perbandingan 1 : 4, kopulasi yang terjadi pada malam pertama adalah 40%; sedang malam kedua, ketiga dan keempat masing-masing adalah 30%, 15% dan 5%; dan 10% sisanya tidak kawin. Sebagai perbandingan, perkawinan monogami pada mencit galur C57BL/10Wt hanya menghasilkan angka kopulasi pada malam pertama sebesar 38%; sedang pada malam kedua, ketiga dan keempat, masing-masing adalah sebesar 5%, 25% dan 5% serta 25% sisanya tidak kawin. Pada galur C57BL/10Wt, perkawinan poligami hanya menghasilkan angka kopulasi 38%, 20%, 28% dan 8%, sedang 5% sisanya tidak kawin (Daniels, 1978; Voipio, 1998; Chung, 1999). Ternyata kondisi yang terjadi di lapangan tidak semuanya sesuai dengan yang disebut dalam kepustakaan.

Sebelum penelitian ini dikerjakan, telah dilakukan tiga kali percobaan dan hasilnya dapat dilihat pada Tabel hasil perkawinan mencit BALB/c pada penelitian pendahuluan (lampiran 9). Dari Tabel tersebut dapat dilihat bahwa bahwa dari 3 kali perkawinan mencit yang baru menginjak dewasa (*nulipara*), baik secara poligami maupun monogami ternyata menghasilkan angka kebuntingan yang rendah, yaitu masing-masing hanya 0%, 8,75% dan 10%. Pada percobaan 1, hewan yang dipakai adalah 80 mencit betina galur BALB/c yang berasal dari hasil biakan di rumah penduduk (di luar laboratorium PAU Jogjakarta), umur 8 – 10 minggu, dengan berat badan rata-rata 17 gram. Setelah dikawinkan secara poligami (1 : 5) selama semalam, ternyata tidak satupun mencit yang dikawinkan tersebut berhasil bunting (*pregnancy rate* = 0%) Hasil ini baru diketahui pada saat pembedahan, yaitu H12, 14, 16 dan 18 pasca kawin (p.k). Hal yang diduga menjadi penyebab kegagalan kebuntingan ini meliputi berbagai faktor. Pertama,

karena mencit-mencit tersebut diperoleh dari biakan di rumah penduduk (*outbred*), maka kemurnian galur mencit tersebut kurang dapat dijamin. Kedua mungkin mencit-mencit tersebut belum siap kawin, karena seharusnya berat badan rata-rata untuk mencit umur 8-12 minggu adalah sekitar 20 gram (Smith and Mangkoewidjojo, 1987; O'Brien and Holmes, 1993), sedangkan berat badan mencit pada penelitian ini rata-rata hanya 17 gram. Hal ini menunjukkan bahwa mencit-mencit tersebut berada pada status gizi yang kurang baik, dan ini tentu mempengaruhi tingkat kesuburan mereka. Pemeliharaan mencit di dalam kandang besar yang dihuni oleh lebih dari 300 mencit (di luar laboratorium PAU/ rumah penduduk) menyebabkan suasana kompetisi untuk hidup yang tinggi. Selain itu pemberian makanan di tempat pemeliharaan tersebut tidak terjamin atau tidak dapat diawasi dengan baik.

Selanjutnya pada penelitian yang ke 2 dan ke 3 telah dilakukan beberapa perbaikan, namun angka kebuntingan yang diperoleh ternyata masih tetap rendah, yaitu 8,75% dan 10% (Lampiran 11). Berdasarkan pengalaman dari tiga percobaan tersebut, pada penelitian ini dilakukan berbagai perbaikan. Pada penelitian ini hewan yang dipilih sebagai model adalah mencit galur BALB/c yang berumur 20-30 minggu, sudah pernah beranak satu atau dua kali (*multipara*) kemudian dikandangkan secara monogami selama 1 malam (12-16 jam) di Pusvetma Surabaya, dan baru dibawa ke Laboratorium PAU Jogjakarta pada H-5 pasca kawin. Sebelum dikawinkan, dilakukan sinkronisasi oestrus secara alamiah, yaitu dengan memanfaatkan fenomena *Lee-boot effect*, *Pheromone effect* dan *Whitten effect* (O'Brien and Holmes, 1993; Barlie, 1989; Anonymous, 2003a) (Lampiran 4). Ternyata dengan metoda sinkronisasi oestrus dan perkawinan tersebut, dari 80 ekor mencit yang dikawinkan secara monogami selama satu

malam, pada pengamatan secara fisik pada H-12 p.k., angka keberhasilan kebuntingan yang dicapai pada penelitian ini adalah sebesar 45/80 atau 56,25%. Angka ini sesuai dengan penelitian Daniels (1978), yaitu sekitar 40-70%, dan lebih baik dibandingkan galur C57BL/10Wt yang hanya 38%. Penulis lain menyebutkan bahwa tingkat kesuburan mencit galur Balb/c hanya sekitar 47%. Angka ini lebih rendah bila dibandingkan dengan mencit galur lain seperti galur AJJ (65%), DBA/2J (75%) ataupun C3H/HcJ (86%) (Eide, 2003). Dengan angka kebuntingan (*pregnancy rate*) sebesar 56,25% ini menunjukkan bahwa metoda perkawinan dengan cara ini cukup baik. Sinkronisasi oestrus secara alami dengan memberi rangsangan bau pejantan (*Pheromone effect*) kepada mencit-mencit yang sejak bunting telah dikumpulkan sesama betina sampai mereka melahirkan dan anak-anaknya siap disapih sehingga tetap dalam kondisi *an-oestrus* (*Lee-Boot effect*), cukup berhasil.

Dari hasil ini dapat disimpulkan pula bahwa untuk memperoleh sejumlah mencit bunting dengan umur kebuntingan yang sama, metoda seperti ini dapat diterapkan pada penelitian-penelitian lain yang memerlukan mencit bunting sebagai model. Usaha untuk meningkatkan angka kebuntingan dengan cara menambah waktu perkawinan atau dengan melakukan persilangan / pertukaran pejantan seperti yang telah dilakukan pada percobaan 3 (Lampiran 11), ternyata justru tidak efektif. Hal ini disebabkan karena adanya *Bruce effect*, yaitu kehadiran pejantan asing pasca kopulasi, justru dapat menyebabkan gagalnya proses implantasi yang seharusnya segera terjadi setelah perkawinan dengan pejantan yang pertama.. (O'Brien and Holmes, 1993, Bailie, 1999, Penn, 1999, Eide, 2003, Anonymous, 2003a)

5.6.3. Pewarnaan ganda (HE dan Apoptag) untuk diagnosis apoptosis

Pada penelitian ini pengamatan sediaan sel-sel plasenta dilakukan dengan menggunakan mikroskop cahaya dengan pembesaran 40 X, dan penghitungan sel-sel yang apoptotik dilakukan pada 20 lapangan pandang dengan pembesaran 100 X, sesuai prosedur yang diuraikan pada Lampiran 6. Pada sediaan yang diwarnai dengan HE (Gambar 5.8.), nampak sel-sel apoptotik dalam berbagai fase; ada yang berbentuk *crescent*, ada yang menunjukkan kondensasi khromatin dan inti yang mengalami fragmentasi. Pada sediaan yang diwarnai dengan *Apoptag*, hanya sel-sel yang sudah mengalami fragmentasi DNA yang menyerap khromogen dan menunjukkan warna coklat di antara jaringan dengan warna dasar hijau. Dari hasil penghitungan sel-sel untuk masing-masing pewarnaan didapatkan hasil yang berbeda (Tabel 5.8.1, Gambar 5.8.1.a dan 5.8.1.b., Tabel 5.8.2., Gambar 5.8.2.a. dan 5.8.2.b.). Dari sini dapat disimpulkan bahwa masing-masing metoda pewarnaan tersebut memiliki kekhususan dan keunggulan.

Pewarnaan HE sebenarnya lebih sensitif karena semua sel terwarnai, sehingga semua sel yang mengalami apoptosis pada semua fase dapat diamati; tetapi menjadi kurang spesifik. Secara teoritik, pewarnaan imunohistokimia mempunyai spesifisitas lebih tinggi, karena ia hanya mendeteksi sel-sel yang benar-benar apoptotik; namun kurang sensitif dibanding pewarnaan HE. (Gambar 5.8.: 1A, 1B, , 2A, dan 2B). Dengan pertimbangan hal-hal tersebut di atas, maka dalam analisis jalur, untuk variabel sel-sel desidua dan trofoblas yang apoptotik, hasil penghitungan dari pewarnaan HE dan *Apoptag* tersebut digabung menjadi satu, karena masing-masing metoda ternyata dalam kedudukan saling melengkapi, bukan saling mewakili (Gambar 5.10.). Dan hasil yang diperoleh dari

penelitian ini dapat disimpulkan bahwa metoda pengamatan sediaan dengan dua pewarnaan ini dapat dipakai pada penelitian-penelitian yang serupa di masa mendatang.

6.6.4. Kondisi geografis, musim dan kejadian toksoplasmosis

Dari penelitian-penelitian yang telah dilakukan oleh penulis, diperoleh dugaan bahwa manifestasi klinik yang timbul akibat infeksi *Toxoplasma gondii* selain dipengaruhi oleh galur, juga dipengaruhi oleh kondisi daerah dan musim. Pada penelitian ini, semula sudah diusahakan untuk mencari dan menggunakan *Toxoplasma gondii* yang berasal dari galur lokal Malang. Hal ini mengingat bahwa pada beberapa dua penelitian sebelumnya yang melibatkan ibu-ibu melahirkan bayi cacat dan ibu-ibu yang mengalami abortus di beberapa Rumah Sakit di Malang, diperoleh hasil bahwa prevalensi toksoplasmosis secara serologis pada kelompok ibu-ibu di Malang tersebut cukup tinggi, yaitu lebih dari 50%. Prevalensi tersebut ternyata tidak berbeda bermakna dibandingkan dengan prevalensi pada ibu-ibu yang melahirkan bayi normal maupun wanita yang hamil normal, yang juga di atas 50% (Sardjono, 2000; Sardjono, 2002a).

Dari hasil dua penelitian tersebut di atas patut diduga bahwa tingginya prevalensi toksoplasmosis di Malang disebabkan oleh *Toxoplasma gondii* galur lokal Malang yang tingkat virulensinya rendah dan belum jelas genotipnya. Dugaan ini diperkuat dengan hasil pemeriksaan PCR yang menggunakan isolat DNA *Toxoplasma gondii* galur RH sebagai kontrol hasilnya positif, sedangkan sumuran yang mengandung DNA sampel semuanya negatif. Pada penelitian Suryawan (2003) di Manado, yang menggunakan primer berbeda dengan Sardjono (2000 dan 2002a), ternyata 5 dan 30 sampel darah dan 9 dan 30

sampel kerokan jaringan abortus menunjukkan hasil PCR positif *Toxoplasma*. Dengan demikian patut diduga bahwa *Toxoplasma gondii* yang menginfeksi populasi di Malang bukan dan galur RH dan berbeda dengan di Manado, dan kedua-duanya belum dapat diidentifikasi galurnya

Dugaan bahwa toksoplasmosis bersifat *seasonal* didasari oleh fakta bahwa pada penelitian terhadap ibu-ibu yang melahirkan bayi cacat diperoleh kenyataan bahwa kejadian bayi lahir cacat menunjukkan adanya pola musiman. Pada penelitian yang dilakukan sejak bulan Mei 1996 - Maret 1998, diperoleh 79 kasus bayi lahir cacat dari 14.610 kelahiran (0.54 %) Dari 79 kasus kelahiran cacat selama hampir dua tahun tersebut, hanya 54 kasus yang dapat diambil sebagai sampel, dan 17 kasus (31,48%) di antaranya terjadi dalam bulan Maret 1997 - Juni 1997 (Sardjono, 2000). Sementara itu, dalam rangka mencari *Toxoplasma gondii* galur lokal sebagai bahan inokulan pada penelitian ini, selama bulan Mei - Agustus 2002 telah dilakukan usaha untuk memperoleh dan mengisolasi bahan inokulan *Toxoplasma gondii* galur lokal, dari kucing liar yang ditangkap di beberapa pasar dan tempat pembuangan sampah (TPA) di Malang. Selama kurun waktu tersebut, telah ditangkap 32 ekor kucing kemudian dikandangkan selama 1 minggu dan setiap hari diambil tinjanya, ternyata tidak satupun di antara contoh tinja yang diambil, mengandung ookista *Toxoplasma* (Sardjono, 2002b). Retno dkk di Surabaya menemukan ookista *Toxoplasma* pada 27% dari tinja kucing liar dan 15% dari tinja kucing peliharaan (Retno, 1996). Dari hasil penelitian-penelitian ini maka patut diduga bahwa toksoplasmosis bersifat *regional* dan *seasonal*. Untuk membuktikan dugaan tersebut diperlukan suatu studi epidemiologik, dengan desain tersendiri

6.6.5. Pemilihan isolat *Toxoplasma gondii* pada penelitian *in vivo*

Dan penelitian ini diperoleh fakta bahwa pada penelitian toksoplasmosis pada mencit, penggunaan *Toxoplasma gondii* galur RH sebagai bahan inokulan, mempunyai keterbatasan waktu yang sangat sempit, yaitu hanya sekitar 2-3 hari. Pengamatan sebelum H-6 p.i. belum dapat menunjukkan dampak patologis akibat infeksi tersebut tetapi bila lebih dari H-8 p.i. mencit yang diinfeksi sudah mati. Kenyataan dapat dijadikan pertimbangan, bahwa untuk mempelajari dampak patologis, penggunaan *Toxoplasma gondii* dari galur virulen mungkin masih dapat diterima, tetapi untuk mempelajari konsep dasar dan patogenesis akibat infeksi yang bersifat khronik, perlu dipilih isolat *Toxoplasma gondii* dari galur yang kurang virulen. Dengan menggunakan galur yang kurang virulen, maka mencit yang diinfeksi dapat bertahan hidup lebih lama dan proses-proses yang terjadi mungkin berjalan lebih lambat, sehingga cukup waktu bagi peneliti untuk mengamati banyak hal yang ingin dikaji dan dipelajari dengan lebih telit dan seksama.

BAB 7

PENUTUP

7.1. Kesimpulan.

Dan hasil pengamatan dan analisis data yang diperoleh pada penelitian ini, diperoleh beberapa kesimpulan, yaitu :

- 7.1.1. Infeksi *Toxoplasma gondii* galur RH pada mencit BALB/c yang terjadi pada awal kebuntingan (periode 1) dengan dosis bertingkat (10, 50 dan 100 takhizoit) menyebabkan penurunan jumlah janin. Pengaruh infeksi dari berbagai tingkatan dosis pada penurunan jumlah janin, ketika infeksi baru berlangsung 3-4 hari (periode 2) belum signifikan ($p = 0.246$; ANOVA Test), dan baru terlihat signifikan ($p = 0.032$; ANOVA Test) setelah infeksi berjalan 6-7 hari (periode 3). Pengaruh yang signifikan tersebut hanya dijumpai bila kelompok dosis inokulasi 100 takhizoit dibandingkan dengan kelompok kontrol ($p = 0,024$; *Post Hoc Test*). Infeksi *Toxoplasma gondii* pada mencit bunting menyebabkan penurunan jumlah janin. Faktor lama berlangsungnya infeksi lebih berperan dan bermakna ($-0,269$, $p = 0.005$) dibanding faktor dosis ($-0,01$; $p = 0,904$; *Path Analysis*).
- 7.1.2. Dampak patologis yang terjadi akibat infeksi *Toxoplasma gondii* menganut kaidah *host-parasite relationship*. Infeksi oleh *Toxoplasma gondii* galur RH, menimbulkan dampak klinis yang nyata tetapi dampak tersebut bukan secara langsung disebabkan oleh parasitnya, melainkan melalui mediator-mediator kimia yang diproduksi oleh sistem kekebalan tubuh. Overproduksi IFN γ akibat infeksi *Toxoplasma gondii* galur RH inilah yang merupakan salah satu mekanisme tidak langsung yang mendasari terjadinya kegagalan kehamilan akibat infeksi *Toxoplasma*

- 7.1.3 Keseimbangan kadar dan produksi berbagai jenis sitokin diyakini sangat berperan pada seluruh tahap kebuntingan mencit. Dominasi sitokin-sitokin Th2 sangat diperlukan untuk menjamin kelangsungan kebuntingan sejak tahap implantasi selesai sampai pada saat kelahiran. Infeksi patogen intraseluler seperti *Toxoplasma gondii*, merangsang sel-sel dendritik atau makrofag untuk memproduksi sitokin-sitokin Th1, termasuk IFN γ . Infeksi *Toxoplasma gondii* galur RH meningkatkan produksi IFN γ hingga kadarnya mencapai sepuluh kali lipat dibanding kelompok kontrol, sehingga keseimbangan sitokin bergeser ke arah Th1. Hasil analisis jalur bahwa peningkatan IFN- γ akibat infeksi *Toxoplasma gondii* galur RH menurunkan jumlah janin secara bermakna (-0.377, p=0.002), menunjukkan bahwa masih banyak hal dan mekanisme yang terjadi pada tingkat molekuler dan seluler, tetapi belum dapat dijelaskan dari hasil penelitian ini. Juga dapat disimpulkan bahwa 62,3% kegagalan kehamilan terjadi melalui jalur lain
- 7.1.4. Sepanjang waktu kebuntingan normal apoptosis tetap terjadi pada seluruh lapisan trofoblas. Laju dan keseimbangan apoptosis sel-sel trofoblas dikendalikan oleh makrofag yang mengisi sebagian besar stroma desidua. Pada kebuntingan normal sel-sel trofoblas relatif lebih resisten terhadap pengaruh Fas. Pada kehamilan dengan infeksi *Toxoplasma gondii* sel-sel makrofag justru mensekresi sitokin-sitokin yang mengubah lingkungan ke arah profil Th1 sehingga menurunkan ketahanan trofoblas terhadap Fas-mediated apoptosis. Peningkatan kadar IFN- γ plasma makin memicu terjadinya apoptosis melalui jalur ekstrinsik, dimulai dengan meningkatnya aktivitas enzim caspase-3 sel-sel trofoblas (0.359, p=0,001)

7.1.5. Peningkatan apoptosis pada sel-sel trofoblas menyebabkan penurunan jumlah janin atau berpengaruh terbalik dengan hasil kebuntingan (-0,718; $p = 0,000$), tetapi tidak demikian pada sel-sel desidua (0,014 $p = 0,809$). Hal ini menunjukkan bahwa keberhasilan suatu kehamilan lebih dipengaruhi oleh viabilitas sel-sel trofoblas dibanding sel-sel desidua.

7.1.6. Kegagalan kebuntingan akibat infeksi *Toxoplasma gondii* melalui jalur peningkatan kadar IFN γ , aktivitas caspase-3 dan apoptosis sel-sel trofoblas adalah salah satu mekanisme yang telah terbukti pada penelitian ini, tetapi masih ada kemungkinan jalur lain, antara lain gangguan mekanisme pembekuan darah. Hal ini memerlukan kajian dan penelitian tersendiri.

7.1.7. Dari rangkaian penelitian tentang toksoplasmosis telah dilakukan oleh penulis di Malang sejak tahun 1996 (Sardjono, 1996; 2000, 2001, 2002a, 2002b) dibandingkan dengan penelitian di Surabaya (Retno, 1998) dan Manado (Suryawan, 2003) diperoleh kesan bahwa toksoplasmosis adalah penyakit yang berciri *seasonal* dan *regional*. Untuk membuktikan hal ini perlu dilakukan suatu penelitian epidemiologis yang didesain tersendiri.

Dari hasil dan analisis yang telah dilakukan pada penelitian ini dapat disimpulkan bahwa infeksi *Toxoplasma gondii* pada kehamilan dapat menyebabkan gangguan dengan berbagai kemungkinan manifestasi klinik, yang berakibat berkurangnya jumlah janin, apabila penyebabnya adalah galur RH/wirulen. Kegagalan kehamilan tersebut lebih cenderung terjadi melalui mekanisme tidak langsung, yaitu peristiwa imuno-biokimiawi yaitu overproduksi dari IFN γ , aktivitas caspase-3 dan apoptosis sel-sel trofoblas, dibandingkan karena pengaruh langsung oleh parasitnya sendiri. Berhentinya proses kehamilan pada toksoplasmosis lebih lebih diprakarsai oleh pihak fetal dibandingkan pihak maternal.

7.2. Saran

Dari penelitian ini diperoleh beberapa hasil samping dan rekomendasi untuk dijadikan pertimbangan, baik untuk menyempurnakan hasil yang telah diperoleh, maupun untuk membuktikan hal-hal baru yang belum ditemukan jawabannya. Hal-hal tersebut antara lain adalah :

- 7.2.1 Untuk memperkuat bukti bahwa terjadinya gangguan kehamilan akibat infeksi *Toxoplasma* tidak harus dihadiri oleh parasit di jaringan plasenta, perlu penelitian ulang dengan melakukan pemeriksaan jaringan plasenta secara immunohistokimia menggunakan antibodi *anti-Toxoplasma* yang dinoklasikan, ditengkapi dengan pemeriksaan PCR dan inokulasi ekstrak jaringan plasenta ke tubuh mencit.
- 7.2.2 Pada penelitian-penelitian lebih lanjut, untuk meningkatkan akurasi hasil penghitungan sel-sel apoptotik, dapat digunakan metoda penghitungan sel seperti pada penelitian ini, dan dipertimbangkan penggunaan pewarnaan HE dan Apoptag, karena keduanya saling melengkapi.
- 7.2.4 Untuk penelitian-penelitian yang bertujuan mempelajari berbagai hal yang berkaitan dengan patogenesis toksoplasmosis, perlu dipertimbangkan penggunaan isolat *Toxoplasma gondii* dan galur yang tingkat virulensinya rendah atau medium, agar cukup waktu bagi peneliti untuk mengamati faktor faktor yang diteliti dengan lebih seksama. Penggunaan galur virulen mempunyai keterbatasan waktu pengamatan, karena sekalipun dengan dosis 1 takhizoit mencit akan mati dalam waktu 7-8 hari setelah inokulasi.
- 7.2.5. Metoda sinkronisasi oestrus dengan memanfaatkan *Whitten effect* dan *Pheromone effect* dapat digunakan pada penelitian-penelitian lain yang membutuhkan sejumlah mencit bunting dalam waktu yang bersamaan.

Usaha meningkatkan angka kehamilan dengan memperpanjang waktu kawin atau melakukan pertukaran pejantan justru tidak efektif.

7.2.6. Dalam praktek sehari-hari perlu dipikirkan penggunaan sarana diagnostik yang mudah dan murah untuk menentukan galur *Toxoplasma* yang menginfeksi, misalnya ELISA kit dengan antibodi spesifik untuk galur lokal, galur RH atau galur virulen lain.

7.2.7. Bila hasil pemeriksaan serologik untuk Toksoplasmosis pada ibu hamil ditemukan positif, tetapi tidak diketahui galur parasit yang menginfeksi, maka pemeriksaan kadar IFN- γ dapat dipikirkan sebagai salah satu faktor yang mempunyai nilai prognostik terhadap hasil kehamilan.



DAFTAR PUSTAKA

- Abbas SK, Lichtman AH, Pober JS. 2000 Cellular and Molecular Immunology 4th. ed WB Saunders Company. Philadelphia.
- Ain R, Tash JS, Soares MJ., 2003 Prolactin-like protein-A is a functional modulator of natural killer cells at the maternal-fetal interface. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 204(1-2):65-74.
- Akira S 2000 The role of IL-18 in innate immunity. *Curr. Opin. Immunol* 12:59.
- Al-Hamdani MM and Mahdi NK. 1997. Toxoplasmosis among women with habitual abortion. *Eastern Mediterranean Health Journal*, 3:10-5.
- Allain JP, Palmer CR, Pearson G. 1998. Epidemiological study of latent and recent infection by *Toxoplasma gondii* in pregnant women from a regional population in the UK. *J Infect* 36:189-96.
- Altintas N, Kuman HA, Akisu C, Aksoy U, Atambay M. 1997. Toxoplasmosis in last four years in Aegean region, Turkey. *J. Egypt Soc Parasitol* 27(2):439-43.
- Anonymous. 1998. Apoptag® *in situ* Apoptosis Detection Kits Manual. Intergen Discovery Products Intergen Company. [http:// www.intergen.com](http://www.intergen.com).
- Anonymous. 2001 Animal Care and Use Training: The Mouse. Johns Hopkins University and Health System. Baltimore
- Anonymous. 2002a. ApopTag. Apoptosis Detection Kits Manual. Serological's Cell Discovery Products Serological Corporation. <http://www.serologicals.com>.
- Anonymous. 2002b. Rats and Mice. The Essential Needs for Animals in Medical Research. Foundation for Medical Research <http://www.fbresearch.org/education/species-sheet-rodents.htm>.
- Anonymous. 2003a Animal Subjects, Breeding Information: Females, Office of Research and Graduate Studies. University of California, Irvine. www.rgs.uc.edu/as/msfem.htm
- Anonymous. 2003b. Apoptosis Overview: Regulation of Apoptosis. Cell Signaling Technology. [www.cellsignal.com.reference](http://www.cellsignal.com/reference)
- Aschkenazi A and Dixit VM. 1998. Death receptors: Signaling and modulation *Science* 281: 1305-8
- Aschkenazi S, Straszewski S, Verwer KMA, Foellmer H, Rutherford T, and Mor G. 2002. Differential Regulation and Function of the Fas/Fas Ligand System in Human Trophoblast Cells. *Biology of Reproduction* 66:1853-61.

- Bahra-Olivieran LMG, Jones JL, Azevedo-Silva J, Alves CCF, Orefice F, Addis DG. 2003. Highly Endemic, Waterborne Toxoplasmosis in North Rio de Janeiro. Brazil Emerging Infectious Diseases. 9(1). Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta. USA.
- Baillie J 2000 Comprehensive Rodent Service Breeding Systems Yale Animal Resources Center. Yale University.
- Baratawidjaja KG 2002 Imunologi Dasar. Edisi ke 5. Balai Penerbit Universitas Indonesia. Jakarta.
- Barnea E 2000. Evolution of Feto-Placental Unit. Early Pregnancy. Biology and Medicine. IV(2): 82-9
- Barret KL, Willingham JM, Garvin AJ, Willingham MC 2001 Advance in Cytochemical Methods for Detection of Apoptosis. The Journal of Histochemistry & Cytochemistry 49(7) 821-32.
- Beckerman KP. 1997: Reproduction and the Immune System, In: Sites DP, Terr AT, Parslow TG. Medical Immunology. 9th ed. Appleton and Lange Stamford: 613-630.
- Beer AE and Kwak Kim JY. 2000: Immunology of Normal Pregnancy. Reproductive Medicine Program. <http://www.repro-med.net/papers/normpreg.html>.
- Benirschke K 2002. Comparative Placentation. Placentation of House (Domestic Laboratory) Mouse. kbenirsch@ucsd.edu.
- Bemas BL, Hill JA 1997. Proliferative responses to recall antigens are associated with pregnancy outcome in women with a history of recurrent spontaneous abortion. J.Clin.Invest. 100(6): 1330-4.
- Bernard RP and Sastrawinata S. 1984. Previous spontaneous abortion (PSAB) in Indonesian University Obstetrics, An Exercise in Programmed MCM-Analysis and Results-Display Feedback. Geneva.
- Blass SL, Puré E, Hunter CA 2001. A Role for CD44 in the Production of IFN γ and Immunopathology During Infection with *Toxoplasma gondii*. The Journal of Immunology, 166b: 5726-32
- Bliss SK, Zhang Y, Denkers EY 1999. Murine neutrophil stimulation by *Toxoplasma* antigen drives high level production of IFN-gamma-independent IL-12 J Immunol. 163:2081-8.
- Boda Z, Laszlo P, Ajzner E, Pfliegler G, Schlamadinger A, 2001 Thrombophilia. Pregnancy, LMWH Thromboprophylaxis, Searching for the Optimal Dose of LMWH Abstract CD3037. Supplement to Journal Thrombosis and Hemostasis. July 2001 (ISSN 0340-6245)

- Bombeli T, Raddatz Muller P, Fehr J., 2001. Evaluation of an optimal dose of low-molecular-weight heparin for thrombo-prophylaxis in pregnant women at risk of thrombosis using coagulation activation markers. *Homeostasis*, 31(2):90-8.
- Bonney EA. 2001. Maternal tolerance is not critically dependent on interleukin-4. *Immunology*. 103. 382-9
- Bowen R, 2000 Placenta: Implantation and Development of the Placenta, Placental Structure and Classification. rbowen@lamaj.colostate.edu.
- Brent RL and Beckman DA 1994 The Contribution of Environmental Teratogens to Embryonic and Fetal Loss. *Clin.Obst.Gyn* , 37(3) 646-670
- Budihardjo I., Oliver H., Lutter M., Luo X., and Wang X. 1999. Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 15. 269-290.
- Carmona F, Font J, Azulay M, Creus M, Fabregues F, Cervera R, Puerto B, Balasch J., 2001 Risk factors associated with fetal losses in treated antiphospholipid syndrome pregnancies a multivariate analysis. *Am J. Reprod Immunol.* 46(4):274-9.
- Carosella ED, Dausset J, and Kirszenbaum M. 1996. HLA-G revisited. *Immunology Today*, 17 (9). 407-409.
- Carosella ED, Rouas-Freiss N, Paul P, Dausset J. 1999, HLA-G. A Tolerance Molecule from the Major Histocompatibility Complex. *Immunology Today*, 20(2) 60-62.
- Carp H. 2004. Cytokines in recurrent miscarriage. *Lupus*, 13(9): 630-4(5).
- Champs D, Pelloux H, Dechelotte P, Giraud JC, Bally N, Ambroise-Thomas P 1998; *Toxoplasma gondii* infections in rats by the RH strain: inoculum and age effects. *Parasite* 5 : 215-8.
- Channon JY and Kasper LH 1996 *Toxoplasma gondii*-induced immune suppression by human peripheral blood monocytes: Role of gamma-interferon. *Infect Immun.* 64 : 431-5.
- Choi WY, Nam HW, Kwak NH, Huh W, Kim YR, Kang MW, Cho SY, Dubey JP 1997 Food-borne Outbreaks of Human Toxoplasmosis. *J. Infect. Diseases.* 175:1280-2.
- Chauvat G, Zourbas S, Ostojic S, Lappree- Delaga G, Dubanchet S, Ledee N, Martal J. 2002. A brief review of recent data on some cytokines expressions at the materno-foetal interface that might challenge the classical Th1/Th2 dichotomy. *Journal of Reproductive Immunity.* 53(1-2): 241-56.
- Chung PH and Yeko TR 1996. Recurrent Miscarriage: Causes and Management, *Hospital Practice* 157-64

- Cohen JJ, 1993: Apoptosis. *Immunology Today*. 14(3): 126-30.
- Cook AJC, Gilbert RE, Buffolano W, Zufferey J, Petersen E, Jenum PA, Foulon W, Semprini AE, Dunn DT. 2000. Sources of toxoplasma infection in pregnant women: European multicentre case-control study. *BMJ*, 521:142-7
- Cotran RS, Kumar VK, Collins T. 1999. *Pathologic Basis of Disease* sixth ed. WB Saunders Company, Philadelphia: pp.1-112.
- Coulam CB. 1986, Unexplained recurrent pregnancy loss: Epilogue. *Clin.Obst. Gynaecol* 29: 999-1004
- Coulam CB. 2000: *Understanding The Immunobiology of Pregnancy and Applying It to Treatment of Recurrent Pregnancy Loss*. *Early Pregnancy: Biology and Medicine*, IV (1) 19-29
- Creasy RK and Resnik R. 1999. *Maternal- Fetal Medicine* 4th ed. WB Saunders Company. Philadelphia: pp.498-531, 569-84.
- Cross JC, Werb Z, Fisher SJ. 1994. Implantation and the Placenta: Key Pieces of the Development Puzzle, *Science*. 266: 1508-16.
- Croy BA, Chantakru S, Esadeg S, Ashkar AA, Wei Q, 2002. Decidual natural killer cells: key regulators of placental development (a review). *Journal of Reproductive Immunity*. 57:151-68.
- Crucerescu E. 1998. Epidemiological data on toxoplasmosis. The aspects of congenital toxoplasmosis (Abstract) (Article in Romanian). *Bacteriol. Virusol. Parazitol.Epidemiol.* 43(3): 147-55.
- Cunningham FG, McDonald PC, Gant NF, Leveno KJ, Gilstrap LC, Hanks GDV and Clark SL. 1997. *Williams Obstetrics* 20th ed. Prentice Hall International Inc., Stamford, USA, pp 69 – 93, 95-123, 579-605, 1309 -11
- Daniels JC 1978. *Methods of Mammalian Reproduction*. Academic Press New York :410-15
- Dardé ML. 1996. Biodiversity in *Toxoplasma gondii*. In: Gross U. *Toxoplasma gondii: Current Topics in Microbiology and Immunology*. Springer-Verlag. Berlin pp.27-44.
- Das C, Kumar VS, Gupta S, Kumar S. 2002 Network of cytokines, integrins and hormones in human trophoblast cells. *Journal of Reproductive Immunology*. 53(1-2): 257-68.
- Decavalas G, Papapetropoulou M, Giannoulaki E, Tzigounis V, Kondakis XG. 1990. Prevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies in gravidas and recently aborted women and study of nsk factors. *Eur J Epidemiol* 6.223-6.

- Denney CF, Eckmann L, and Reed SL. 1999. Chemokine secretion of human cells in response to *Toxoplasma gondii* infection. *Infect Immun.* 67(4):1547-52.
- Dubey JP. 1972. A simplified method for isolation of *Toxoplasma gondii* from faeces of cats. Dalam: Sasmita R. 1991: Infeksi buatan *Toxoplasma gondii* isolat Surabaya: Beberapa aspek serologis, gambaran darah dan histopatologis mencit (*Mus musculus*). Naskah Disertasi. Universitas Airlangga.
- Dubey JP, Lindsay DS, Spear CA. 1998. Structures of *Toxoplasma gondii* Tachyzoites, Bradyzoites and Sporozoites and Biology and Development of Tissue Cysts. *Clinical Microbiology Review.* 11 (2): 267-99.
- Dubey JP, Shen SK, Kwok OCH, Frenkel JK. 1999. Infection and immunity with the RH strain of *Toxoplasma gondii* in rats and mice. *J.Parasitol.* 85(4):657-62.
- Dudley DJ. 1995. Recurrent Pregnancy Loss and Cytokines, Not as Simple as it Seems, *JAMA;* 273 (24) :1958-9.
- Dupouy-Carnet J. 1997. Immunopathogenesis of toxoplasmosis in pregnancy. <http://www.users Imaginet.Fri/@dipouy Ca/toxoplasmosis.html>.
- Eide D. 2003. *Biology of Laboratory Animal.* Norwegian Institute of Public Health.
- Ejima K, Koji T, Tsuruta D, Nanri H, Kashimura M, Ikeda M, 2000: Induction of Apoptosis in Placenta of Pregnant Mice Exposed to Lypopolysaccharides: Possible involvement of Fas/Fas ligand System. *Biol Reprod* 62(1): 178-85.
- Evans R. 1992. Life cycle and animal infection. In: Ho-Yen DO and Joss AWL. *Human Toxoplasmosis.* Oxford University Press. Oxford. pp:26-51.
- Everet C. 1997. Incidence and outcome of bleeding before the 20th week pregnancy: Prospective Study from General Practice, *British Medical Journal;* 315 : 32-34.
- Firth T . 1999. Organization and diversity in the placenta. Division of Biomedical Sciences, Imperial College School of Medicine.a.firth@ic.ac.uk.
- Fricke-Hidalgo H, Pelloux H, Racinet C, Grefenstete I, Bost-Bru C, Goullier-Fleuret A, Ambriose-Thomas P. 1998. Detection of *Toxoplasma gondii* in 94 placentae from infected women by polymerase chain reaction, in vivo and in-vitro cultures. *Placentae;* 19(7): 545-9.
- Frenkel JK. 1973. *Toxoplasma* in around of us. *Bioscience* 23:343-52.
- Gandahasada S.1977; *Survai Zat Anti Toxoplasma di Jakarta, Seminar Nasional Parasitologi I.* Kampus IPB. Taman Kencana, Bogor.
- Gandahasada S. 1985. Hubungan antara zat anti *Toxoplasma gondii* dengan mwayat abortus. *Seminar Parasitologi Nasional IV.* Yogyakarta.

- Gandahusada S. 1995. Penanggulangan Toxoplasmosis dalam meningkatkan kualitas sumber daya manusia, Pidato Pengukuhan Guru Besar Tetap FKUI, Jakarta. 25 Maret 1995.
- Gandahusada S. 1999. Diagnosis laboratoris *Toxoplasma*. Maj Kedokt. Indon. 49(6). 212-8.
- Gravilescu LC, Denkers EY., 2001. IFN-gamma overproduction and high level apoptosis are associated with high but not low virulence *Toxoplasma gondii* infection. *Journal of Immunology*. 167(2): 902-9.
- Guilbert LJ. 1996. There is a bias against type 1 (inflammatory) cytokine exoression and function in pregnancy. *J. Reprod.Immunol* 32(2). 105 -110.
- Guo ZG and Johnson AM. 1996. DNA Polymorphisms Associated with Murine Virulence of *Toxoplasma gondii* Identified by RAPD-PCR. in: Gross U *Toxoplasma gondii*. Current Topics in Microbiology and Immunology Springer-Verlag Berlin pp17-26.
- Haanen C. 1999. Clinical aspects of Apoptosis. Workshop #2405. Impact of Apoptosis (Programmed Cell Death) for Clinical Laboratory Sciences. <http://www.apoptosis.net>.
- Halonen SK, Chiu FC, Weiss LM. 1998. Effect of cytokines on growth of *Toxoplasma gondii* in murine astrocytes. *Infect Immun* 66(10). 4989-93.
- Halperin R, Peller S, Rotschild M, Bukovsky I, Schneider D. 2000. Placental Apoptosis in Normal and Abnormal Pregnancies. *Gynecol Obstet Invest* 50:84-87.
- Hatasaka HH. 1994. Recurrent Miscarriage : Epidemiologic factors, definitions and incidence. *Clin Obst Gyn* 37 (3) 625-34.
- Hatasaka HH and Scott JR. 1996. The Immune Factor. In: Adashi EY, Rock JA, Rosenwaks Z. *Reproductive Endokrinology, Surgery and Technology*. Volume 2. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia pp 2288-2308.
- He N, Adai F, Hye-Seong M, Sekiya S, Yano A. 1997. Cytokine production assayed by RT-PCR in pregnant mice infected by *Toxoplasma gondii* as a model of congenital toxoplasmosis. *Japanese Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 59:67.
- Henderson WR and Chi EY. 1998. The Importance of Leukotrienes in Mast Cell-Mediated *Toxoplasma gondii* Cytotoxicity. *The Journal of Infectious Diseases*. 177: 1437-43.
- Heryanto A, Perangin-angin THA, Yazid A. 1985. Toxoplasmosis pada babi. Studi kasus dan Isolasi. Laporan tahunan hasil penyidikan penyakit hewan di Indonesia periode 1983-1984. Direktorat Kesehatan Hewan Direktorat Jendral Peternakan Departemen Pertanian.

- Hetts SW 1998. To die or not to die, An overview of apoptosis and its role in disease, *Jama*. 279(4): 296-303
- Hill JA, Polgar K, Anderson DJ 1995: T-helper 1-type Immunity to Trophoblast in Women with Recurrent Spontaneous Abortion, *JAMA*. 273(24): 1933-1936.
- Hilla R 1997 The Immunology of Normal Pregnancy versus that of Recurrent Spontaneous Abortion. Dept. of Microbiology, James Cook University of North Queensland. <http://www.capsid.jcu.au/micro/publicat/essays/rebecca.htm>.
- Hirabayashi H, Sato T, Kohno S, Tanaka M, Kobayashi S, Ohta Y, Iguchi T. 1999. Apoptotic cell death in artificially induced decidualoma of pseudo-pregnant mice. *Anat Rec.*, 254(2). 205-13.
- Hrgovic Z, Habibovic S, Hrgovic I, Erman-Vlahovic M, Topolovec Z. 2000. Molecular mechanism of apoptosis. *Periodicum Biologorum*. 102(4): 355-64.
- Hunt JS, Petrof MG, Burnet TG.. 2000 Uterine leukocytes: key players in pregnancy *Seminars in Cells & Developmental Biology*, 11(2): 127-37.
- Hunter CA, Subauste CS, Remington JS. 1994a Production of IFN- γ by NK cells from *Toxoplasma gondii* infected SCID mice: regulation by IL-10, IL-12 and TNF- α . *Infect. Immun.* 62: 2818-24.
- Hunter CA, Subauste CS, Remington JS. 1994b: The role of cytokines in toxoplasmosis. *Biotherapy*: 7(3/4). 2347-47.
- Hyde JE. 1990: Parasite and immune system. in *Molecular Parasitology*. Von Nostrand Reinhold, New York: 118-41
- Jenkins C, Robert J, Wilson R, Maclean MA, Shilito J, Walker JJ., 2000. Evidence of Th1 type response associated with recurrent miscarriage *Fertility and Sterility*. 73(6):1206-8.
- Jensen L, Heegaard PM, Lind P. 1998 A study of virulence parameters for *Toxoplasma gondii* infections in mice. *Parasitol Res May* 84:382-7
- Jenum PA, Kapperud G, Stray Pedersen B, Melby KK, Eskild A, Eng J. 1998. Prevalence of *Toxoplasma gondii* specific immunoglobulin G antibodies among pregnant women in Norway. *Epidemiol Inf* 120:87-92.
- Jerzak M, Kasprzycka M, Wierbicki P, Kotarski, Gorski A. 1998: Apoptosis of T cells in the first trimester of human decidua *Am J Reprod Immunol*. 40(3): 130-5
- Jerzak M and Bischof P 2002 Apoptosis in the first trimester decidua: the role of maintaining immune tolerance at the maternal-foetal interface and in the trophoblast remodeling *European Journal of Obstetry & Gynecology and Reproductive Biology* 100 136-42.

- Joswig A, Gabriel HD, Kibschull M, Winterhager E. 2003. Apoptosis in uterine epithelium and decidua in response to implantation: Evidence for two different pathways. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 1(1): 44
- Kaider BD., Purvis MT, Kovacs L, Coulam CB, Roussev RG. 1996: In vitro effect of antophospholipid antinuclear and antithyroid antibodies upon murine cultured embryos. *Am J Reprod Immunol* 35: 459.
- Kasper LH and Boothroyd JC. 1993. *Toxoplasma gondii* and Toxoplasmosis, In : Warren KS. *Immunology and Molecular Biology of Parasitic Infections*, Blackwell Scientific Publications, 269-301.
- Kasper LH, 1998. *Toxoplasma* Infection, In : Fauci AL, Braunwald E, Isselbacher, KJ, Wilson JD, Martin JB, Kasper DL, Hauser SL, Longo DL. *Harrison's Principle of Internal Medicine*, 14th ed. , McGraw-Hill, New York. : 1197-1202.
- Kaufmann SHE. 1995. Immunity to Intracellular Microbial Pathogen. *Immunology Today*, 16(7):338-42.
- Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR. 1972: Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J Cancer* . 26: 239-57.
- Khrisnan L, Guilbert LJ, Wegmann TG, Belosevic M and Mosmana TR. 1997. In. Ragupathy R. Th1-type immunity is incompatible with successful pregnancy. *Immunology Today*.;18(10):478-82.
- Klein JO and Remington JS. 1995. Current Concepts of Infections of the Fetus and Newborn Infant. In : Remington JS, Kleins JO, eds. *Infectious diseases of the fetus and newborn infants*, 4th ed. WB Saunders, Philadelphia. ; 1-19.
- Kobayashi M, Aozai F, Hata H, Mun HS, Tagawa Y, Iwakura Y, Yano A. 1999. *Toxoplasma gondii*. Difference of Invasion into Tissue of Digestive Organs between Susceptable and Resistant Strain and Influence of IFN- γ in Mice Inoculated with the Cysts Perorally. *J Parasitol*. 85(5):973-5.
- Kokawa K, Shikone T, Nakano R. 1998a. Apoptosis in human chorionic villi and decidua in normal and ectopic pregnancy. *Mol Hum Reprod*. 4(1): 87-91.
- Kokawa K, Shikone T, Nakano R. 1998b. Apoptosis in human chorionic villi and decidua during normal embryonic development and spontaneous abortion in the first trimester. *Placenta*. 19(1): 21-6
- Koonin LM, Smith JC, Ramick M, Straus LT. 1998. Morbidity and mortality weekly report Centers for Disease Control and Prevention; 47 (SS-2).
- Kostovic-Knezvezic Lj, Gajovic S, Grbesa D. 2001. Human embryonic development. In : Kurjak A., Chervenak FA, Carrera JM. 2001. *The Embryo as a Patient*. The Parthenon Publishing Group. New York. Pp 1-11.
- Kuby, 1994. *Immunology*. 2nd ed. New York: W.H Freeman.

- Laboratorium Obstetri Ginekologi RSUD dr Saiful Anwar Malang .1997: Laporan Tahunan Data Persalinan dan kunjungan Poliklinik tahun 1995 – 1997.
- Laird SM, Tuckerman EM, Cork BA, Linjawi S, Blakemore AI, Li TC.. 2003 Human Reproduction Update, 9(2) 163-74.
- Lewis A. 2004. Why isn't the foetus rejected? A study of the changes that occur in the mammalian immune system to allow for successful pregnancy. Faculty of Health and Biosciences, UEL, Stratford, London, E15. www.standupgirl.com
- Liesenfeld O, Kosek JC, Suzuki Y, 1997. Gamma Interferon Induces Fas-Dependent Apoptosis of Peyer's Patch T Cells in Mice Following Peroral Infection with *Toxoplasma gondii*. Infection and Immunity. 65(11):4682-9.
- Liu Z, Chen Y, Yang Y, Peng JP. 2002. The effect of MCH class II expression and apoptosis in placenta by IFN γ administration. Contraception. 65. 177-84.
- Loke YW and King A, 1995. Human Implantation: Cell Biology and Immunology. Cambridge University Press, New York. Pp 5-62
- Luppi P. 2003 How immune mechanisms are affected by pregnancy Vaccine, 21.3352-7.
- Lyall F, Bulmer JN, Kelly H, Duffie E, Robson SC 1999 Human Trophoblast Invasion and Spiral Artery Transformation. The Role of Nitric Oxide. Am.J Pathol. 154 (4): 1105-1114
- Majno G and Jans I 1995 Apoptosis, Oncosis and Necrosis. Am.J.Pathol. 146 (1) 3-15.
- Makhsed MAA 2004 The possible immunological basis of repeated pregnancy loss Royaninstitute.org/Award/Abstracts/SeAwAbs-25.htm. 28 Sept.2004
- Maruo T, Ishihara N, Samoto T, Murakoshi H, Laoag-Fernandez JB, Matsuo H 2001 Regulation of Human Trophoblast Proliferation and Apoptosis During Pregnancy Fourth World Conference on Early Pregnancy, Continuum Between Implantation and Perinatal Events V(1). 28-9.
- McCabe RE and Remington JS. 1990 Toxoplasmosis. in : Warren KS and Mahmoud AAF Tropical and Geographical Medicine 2nd ed. McGraw-Hill Information Service Company, New York, 309-203
- McKerrow J 1997 Parasitic Diseases. In: Stites DP et.al. Medical Immunology 9th ed. Appleton & Lange, Stamford. : 725-738.
- Medawar PB 1953 Some immunological and endocrinological problems raised by the evolution of viviparity in vertebrates Symp.Soc.Exp.Biol. 44:320 In Cross JC Werb Z Fisher SJ. 1994. Implantation and the Placenta Key Pieces of the Development Puzzle, Science. 266: 1508-16

- Mor M and Abrahams VM 2003. Potential role of macrophages as immunoregulators of pregnancy. *Reproductive Biology and Endocrinology* 1:119
- Morque DG, Monroy F, Regna ML, Dinarello CA and Sibley LD 2001. Acute Toxoplasmosis Leads to Lethal Overproduction of Th1 Cytokines. *The Journal of Immunology*, 167, 4574-84
- Munn DH, Zhou M, Attwood JT, Bondarev I, Conway SJ, Marshall B, Brown C, Mellor AL 1998. Prevention of Allogeneic Fetal Rejection by Tryptophan Catabolism. *Science* . 281 1191-93.
- Musa MS dan Nasution AH. 1989 Perancangan dan Analisa Percobaan Ilmiah Depdikbud- Dirjen Dikbud, PAU-IPB.
- Mischik N, Schade B, Dytnerka K, Diuganska H, Reichman G, Fischer H. 2001. Attenuation of mouse-virulent *Toxoplasma gondii* parasites is associated with decrease in interleukin-12-inducing tachyzoite activity and reduced expression of actin catalase and excretory proteins (1)(1). *Microbes Infect.* 3:689-99.
- Norwitz ER, Schust DJ, Fisher SJ. 2001. Implantation and the Survival of Early Pregnancy. *The New England Journal of Medicine*. 345 (19): 1400-8
- O'Brien C and Holmes M 1993. The Mouse. *ANZCCART News*. 6(2). 1-4
- Owen MR, Clarkson MJ, Trees AJ. 1998a. Diagnosis of toxoplasma abortion in ewes by polymerase chain reaction. *Vet Rec*; 142 (17) : 445-8
- Owen MR, Clarkson MJ, Trees AJ. 1998b. Acute phase toxoplasma abortions in sheep. *Vet Rec.*; 142 (18). 480-2.
- Pappas PW and Wardrop SM 2001. The *Toxoplasma gondii* life cycle. *Expert Reviews in Molecular Medicine*. Cambridge University Press
- Partono F and Cross JH. 1975. *Toxoplasma* Antibodies in Indonesian and Chinese Medical Students in Jakarta, Southeast Asian. *J Trop.Med.Publ.Hlth* ; 6:472-6.
- Penn D 1999. A House Mouse Primer. Wayne Potts Laboratory, Department of Biology University of Utah. http://stormy.biology.utah.edu/ab/mouse_primer.htm
- Piccinini MP, Scaletti C, Vultaggio A, Maggi A, Romagnani S. 2001. Defective production of LIF, GM-CSF and Th2 type cytokines by T-cells at fetomaternal interface is associated with pregnancy loss. *Journal of Reproductive Immunology* 52. 35-43
- Pietranonni M 2002. Recurrent Pregnancy Loss. Kentucky Women's Health. eNewsletter/ April 2002.

- Pizem J and Cor A. 2003. Detection of Apoptotic Cells in Tumour Paraffin Sections. *Radiol. Oncol* 37(4): 225-32
- Pranoto I, Sofowean S, Dasuki D. 1994: Tes skrining Toxoplasma pada ibu hamil. PTP III POGI, Medan
- PT Charoen Pockphan Indonesia, Kandungan pellet BR 1-B
- Qumsiyeh MB, Kim KR, Ahmed MN, Bradford W. 2000. Cytogenetics and mechanisms of spontaneous abortions: increased apoptosis and decreased cell proliferation in chromosomally abnormal villi. *Cytogenetics and Cell Genetics* 88: 230 – 235.
- Ragupathy R. 1997. Th1-type immunity is incompatible with successful pregnancy. *Immunology Today*.. 18(10):478-82
- Remington JS, McLeod R, Desmonts G. 1996. Toxoplasmosis. In : Remington JS, Kleins JO. eds. *Infectious diseases of the fetus and newborn infants*, 4th ed. WB Saunders, Philadelphia, : 140-260.
- Renfree, M. B. 1982. Implantation and placentation. In Austin, C. R. and Short, R. V (eds) *Reproduction in Mammals 2. Embryonic and Fetal Development* (Second edition). Cambridge University Press, Cambridge. : 26 - 69.
- Retno ND, Sasmita R, Supnhati E, Yunus M dan Mufasirin. 1998. Kejadian Toxoplasmosis pada Kucing Liar dan Kucing Peliharaan di Kotamadya Surabaya. *Media Kedokteran Hewan*, 14(2):94-97.
- Reutelingsperger C. 1999. Molecular Biology of Apoptosis. Workshop #2405 Impact of Apoptosis (Programmed Cell Death) for Clinical Laboratory Sciences <http://www.apoptosis.net>
- Roberts CW and Alexander J. 1992. Studies on a murine model of congenital toxoplasmosis: vertical disease transmission only occurs in BALB/c mice infected for the first time during pregnancy. *Parasitology*, 104: 19-23
- Rote NS, Vogt E, De Vere G, Obinger Ar, Ng AK. 1998. The role of placental trophoblast in pathophysiology of the phospholipid antibody syndrome. *Am J Reprod Immunol* 39: 125-36
- Rowe MK and Chuang DM, 2004. An overview of pathways regulating apoptosis. *Expert Reviews in Molecular Medicine*. 6(21). Abstract. Cambridge University Press.
- Rugh R. 1970. *Laboratory Manual of Vertebrate Embryology*. Fifth ed. Burges Publishing Company Minneapolis, Minnesota : 182-98
- Runic R, Lockwood CJ, LaChapelle L, Dipasquale B, Demopoulos RI, Guller S. 1998. Apoptosis and Fas Expression in Human Fetal Membrane. *J Clin Endocrinol Metab* 83,(2): 560-6

- Russo M and Galanti B: Prevention of congenital toxoplasmosis. Clin Ter; 1990; 134 (6). 383-92
- Saito S 2000 Cytokine network at the feto-maternal interface. Journal of Reproductive Immunology. 47 .87-103.
- Samil RS 1988 Toxoplasmosis pada ibu hamil dan bayi. Seminar sehari penyakit-penyakit manusia yang ditularkan oleh hewan piaraan Jakarta, Oktober, 1988.
- Sanchez-Torres LE. 2003. Apoptosis: the phenomenon and its determination. Tec Pecu Mex 41(1): 49-62
- Sardjono TW, Sri Oemirri, Soebaktiningsih. 1988. Pemeriksaan Pendahuluan Toxoplasmosis dengan metode IHA pada ibu-ibu hamil di RSUD dr Saiful Anwar Malang. Maj Kedokt. Trop. Indon., 1 (1) 39-47
- Sardjono TW, Hidayat A, Aulanniam, Irfan M.1998 Zat anti Toxoplasma pada ibu-ibu yang melahirkan bayi cacat di beberapa Rumah Sakit di Kodya Malang, selama tahun 1997. Maj.Ked.Ind.48(11). 431-435.
- Sardjono TW, Aulanniam, Achmad Hidayat, Irfan M. 2000: Keberadaan *Toxoplasma gondii* di janingan plasenta dideteksi dengan teknik PCR dan hubungannya dengan cacat bawaan. Maj. Kedokt. Trop. Indon. 11(1):6-16.
- Sardjono TW, Nurseta T, Wahyudi I, 2001 Hubungan antara kadar antibodi *Toxoplasma* pada ibu-ibu hamil dengan kejadian abortus spontan di RSUD dr Saiful Anwar Malang. Semiloka Nasional Parasitologi, Batu, 9-11 Pebruari 2001.
- Sardjono TW, Soewarto S Mudjiwiyono, Muhammad L. 2002.a. The evidence of toxoplasmosis in spontaneous abortion cases in Dr. Saiful Anwar Hospital detected by serological histopathological and PCR analyses Maj Kedokt Unibraw XVIII (2). 77-82.
- Sardjono TW, Heryanto A, Suryanto I 2002b. Isolasi ookista *Toxoplasma gondii* dan parasit usus lain dari tinja kucing yang ditangkap dan berbagai pasar dan TPA di Kota Malang (Penelitian pendahuluan, belum dipublikasikan).
- Sardjono TW 2003 Optimasi dosis inokulan *Toxoplasma gondii* galur RH pada mencit galur Balb/c dan perubahan patologis yang terjadi pada darah tepi, jaringan otak dan hepar. (Penelitian Pendahuluan, belum dipublikasikan)
- Savion S, Lepsky E, Orensten H, Charp H, Shepshlovich J, Torchinsky A, Fein A, Todler V 2002 American Journal of Reproductive Immunity. 47(2); 118.
- Sayogo dan Gardahusada S. 1980 Survei titer zat anti *Toxoplasma gondii* pada wanita hamil trimester terakhir di RS Ciptomangunkusumo, Jakarta MKI. 30 237-41

- Schafer-Somi S. 2003. Cytokines during early pregnancy of mammals: a review. *Animal Reproduction Science*, 75 : 73-94.
- Scott JR (1994). Recurrent Miscarriage : Overview and Rommendations; *Clinical Obstetrics and Gynaecology*; 37 (3): 768-773.
- Shen DF, Matteson DM, Tuailon N, Suedekum BK, Buggage RR, Chan CC. 2001, Involvement of Apoptosis and Interferon γ in murine Toxoplasmosis. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 42(9):2031-6.
- Shiraishi H, Hayakawa S, Satoh K (1996). Murine experimental abortion by IL-2 admistration is caused by activation of cytotoxic T lymphocytes and placental apoptosis. *J.Clin.Lab.Immunol.* 48(3): 93-108.
- Sibley LD and Howe DK. 1996. Genetic Basis of Pathogenicity in Toxoplasmosis. In: Gross U. *Toxoplasma gondii: Current Topics in Microbiology and Immunology*. Springer-Verlag. Bertin. pp.3-16.
- Smith JB and Mangkoewidjojo S. 1987. The Care, Breeding and Management of Experimental Animals for Research in Tropics. International Development Program, Australian Universities and Colleges, Canberra.
- Smith SC, Baker PN, Symond EM. 1997. Placental Apoptosis in normal human pregnancy. *Am.J Obstet Gyencol.* 177:57-65.
- Sofowean SHM : Infeksi TORCH pada kehamilan, Simposium Infeksi TORCH dan Anerob, PTP VII POGI, Surakarta, 27 – 30 Juni 199
- Soini Y, Paakko P, Lento VP. 1998. Histopathological Evaluation of Apoptosis in Cancer. *Amer.J. Pathol.*, 153: 1041-53.
- Steller H, 1995. Mechanisms and genes of cellular suicide, *Science*, 267:1445-9.
- Stemmer SM. 2000. Three Months in Review. Current Progress in Early Pregnancy Investigation. *Early Pregnancy: Biology and Medicine*; IV (1): 214-218.
- Stites DP, Terr AI, Parslow TG. 1997. *Medical Immunology*, 9th ed. Appleton & Lange Stanford . California.
- Stojanovic D.(1998). The effect of toxoplasmosis on occurrence of spontaneous abortions and anomalies in neonates in the Timok region, *Vojnosanit Pregl.*, 55 (2) . 151-9.
- Stray-Pedersen B 1997 Forum Diagnosticum. Prodia Diagnostics Educational Services; 6:3315-22. (Alih bahasa Laboratorium Klinik Prodia)
- Su C, Howe DK, Dubey JP, Ajoka JW, Sibley LD. 2002. Identification of quantitative trait loci controlling acute virulence in *Toxoplasma gondii*. *PNAS*. 99 (16). 10753–10756

- Suryawan A, Masengi-Rumopa JA, Tuda JSB. 2003 *Toxoplasma gondii* identification in spontaneous abortion with nested PCR, Kongres Nasional XI PETRI dan Kongres Nasional VI PKWI Agustus 2003. Manado.
- Suzuki Y, Orellana MA, Schreiber RD, Remington JS. 1988. Interferon- γ , the major mediator of resistance against *Toxoplasma gondii*. *Science*; 240:516-8.
- Suzuki K, Kobayashi M, Kobayashi K, Shiraishi Y, Goto S, Hoshino T. 1997. Structural and functional change of blood vessel labyrinth in maturing placenta of mice. *Trophoblast Research*; 9:155-164.
- Takahashi J, Fukuda T, Tanaka J, Minamitani M, Onouchi K, and Makioka A. 2001. Bax-induced apoptosis not demonstrated in the congenital toxoplasmosis in mice. *Brain and Development*; 23(1):50-3.
- Tambunan KL, Wijono E, Kampono N, Suryana EJ, Endjun JJ, Witaksono J, Toegiono Y, Sudoyo AW., 2001. Fetal loss in the antiphospholipid syndrome and thrombophilia. successful therapy with unfractionated heparin or low molecular weight heparin (nadroparin) combined with aspirin. Abstract: CD3262. Supplement to *Journal Thrombosis and Hemostasis*, July 2001 (ISSN 0340-6245)
- Thellin O, Coumans B, Zorzi W, Igout A, Heinen E. 2000. Tolerance to the foeto-placental "graft" : ten ways to support a child for nine months. *Current Opinion in Immunology*. 12:731-7.
- Thiet MP, Suwanvanichkij V, Hasselblatt K, Yeh J. 2000. Apoptosis in Human Term Placenta: A Morphological and Gene Expression Study. *Gynecol Obstet Invest* 50: 88-91
- Tho PT, Byrd JR, McDonough PG. 1979. Etiologies and subsequent reproductive performance of 100 couples with recurrent abortion. *Fertil Steril* 32:389-95.
- Thornberry NA. 1998. Caspases: key mediators of apoptosis. *Chem Biol*, 5:97-103.
- Vermes J. 1999. Introduction: Pathological vs physiological cell death. Workshop #2405. Impact of Apoptosis (Programmed Cell Death) for Clinical Laboratory Sciences. <http://www.apoptosis.net>.
- Vinatier D, Dufour P, Cosson M, Houpeau JL. 2001. Antiphospholipid syndrome and recurrent miscarriage. *Eur J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol* 96(1):37-50.
- Vince GS and Johnson PM. 1996. Is there a Th2 bias in human pregnancy? *Journal of Reproductive Immunology*, 32(2). 101-4.
- Voipio HM and Nevalainen T. 1998. Improved method for vaginal plug detection in rats. *Scand J Lab Anim Sci*. 25: 5-9

- Warren KS. 1993. *Immunology and Molecular Biology of Parasitic Infections*. Blackwell Scientific Publication. Oxford.
- Wegmann TG, Lin H, Guilbert L, Mosmann TR. 1993. Bidirectional cytokine interactions in the maternal-fetal relationship-is successful pregnancy a Th-2 phenomenon?. *Immunology Today*; 14: 353-6.
- Willingham CM. 1999. *Cytochemical Methods for the Detection of Apoptosis*. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*; 47:1101-10.
- Wynn TA and Kwiatkowski D. 2004. *Immune Pathology of Parasitic Disease*. gMap.net Library. <http://www.gmap.net/ippd.htm>.
- Yui J, Garcia-Lloret M, Wegmann TG, Guilbert LJ. 1995. Cytotoxicity of tumor necrosis factor alpha and gamma interferon against primary human placental trophoblast. *Placenta*; 15 : 819-35.
- Zargar AH, Masoodi, SR, Laway BA, Sofi, BA, Wani AI. (1998). Seroprevalence of toxoplasmosis in women with repeated abortion in Kashmir. *J. Epid. Comm.Hlth.*; 52:35-6.
- Zenner L, Darcy F, Cesbron-Delauw MF, Capron A. 1993. Rat model of congenital toxoplasmosis: rate of transmission of three *Toxoplasma gondii* strains to fetuses and protective effect of a chronic infection. *Infect.Immun.* 61: 360-3.
- Zeus R. 1998. *The Development of Human Embryo*. Langman, *Medical Embryology*. William and Wilkins Press. Chicago.

Lampiran 1.

Cara pemberian nomor/kode pada mencit

Semua mencit beserta bahan pemeriksaan yang lain diberi nomor/kode sesuai dengan nomor mencit yang bersangkutan. Nomor/Kode terdiri dari 3 karakter, masing-masing mengandung maksud sebagai berikut.

- Digit 1 : menyatakan kelompok dosis, yaitu
 - A = dosis 1 = 10 takhizoit
 - B = dosis 2 = 50 takhizoit
 - C = dosis 3 = 100 takhizoit
 - D = plasebo/kontrol, hanya diinjeksi PBS
- Digit 2 : menyatakan hari pembedahan, yaitu
 - P = H.12
 - Q = H.14;
 - R = H.16 dan
 - S = H.18
- Digit 3 : menyatakan nomor mencit dari tiap-tiap kelompok, yaitu :
 - 1 = mencit ke 1
 - 2 = mencit ke 2
 - 3 = mencit ke 3
 - 4 = mencit ke 4 dan
 - 5 = mencit ke 5

Penomoran masing-masing mencit dilakukan dengan mewarnai bagian tubuh mencit dengan asam pikrat, seperti yang diuraikan pada tabel 4.3

Tabel lampiran 1 . Cara memberi nomor pada mencit

Kode	Arti kode	Bagian tubuh yang diwarnai
P	H-12	Kaki depan kiri
Q	H-14	Kaki belakang kiri
R	H-16	Kaki depan dan belakang kiri
S	H-18	Kaki kiri tidak diberi warna (polos)
1	No 1	Kepala
2	No 2	Punggung
3	No 3	Kaki depan kanan
4	No 4	Kaki belakang kanan
5	No 5	Ekor

Contoh:

- Mencit yang berada di kandang B dengan warna di kaki belakang kiri dan kaki depan kanan adalah bernomor BP3, yaitu mencit ke-3 dan kelompok dosis 2 yang akan dibedah pada hari ke 12.
- Mencit yang ada di kandang D dengan warna di kepala saja berarti nomor DS1, yaitu mencit pertama dan kelompok kontrol (tidak diinfeksi) yang akan dibedah pada hari ke 18.

Lampiran 2. Lembar pencatatan data observasi menilik sejak partus sampai dengan saat pembedahan

No mencit	Tgl partus	jml anak	Kwn H-1	trns port H-5	inku lasi H-9	Hari pembedahan				Hm/ Tdk	Jml janin (regresi/total)		Jml. takhizoit
						H12	H14	H16	H18		Kanan	Kiri	
AP	1												
	2												
	3												
	4												
	5												
BP	1												
	2												
	3												
	4												
	5												
CP	1												
	2												
	3												
	4												
	5												
DP	1												
	2												
	3												
	4												
	5												

No mencit	Tgl partus	Jml anak	Kwn H-1	Hmrl/ Tdk					Jml litter (regresi/total)		Jml. takhizoit	
				H-5	H-9	H12	H14	H16	H18	Kanan		Kiri
AQ	1											
	2											
	3											
	4											
	5											
BQ	1											
	2											
	3											
	4											
	5											
CQ	1											
	2											
	3											
	4											
	5											
DQ	1											
	2											
	3											
	4											
	5											

No mencit	Tgl partus	jml anak	Kwn H-1	trans port	inoku lasi	Hari pembedahan				Hml/ Tdk	Jml hiters (regresi/total)		Jml taktisasi
				H-5	H-9	H12	H14	H16	H18		Kanan	Kiri	
AR	1												
	2												
	3												
	4												
	5												
BR	1												
	2												
	3												
	4												
	5												
CR	1												
	2												
	3												
	4												
	5												
DR	1												
	2												
	3												
	4												
	5												

No mencit	Tgl partus	jml anak	Kwu H-1	trans port	inoku lasi	Hari pembedahan				Hml/ Tdk	Jml liters (regresi/total)		Jml takhizait
				H-5	H-9	H12	H14	H16	H18		Kanan	Kiri	
AS	1												
	2												
	3												
	4												
	5												
BS	1												
	2												
	3												
	4												
	5												
CS	1												
	2												
	3												
	4												
	5												
DS	1												
	2												
	3												
	4												
	5												

Lampiran 3.

Bahan inoculan dan pelaksanaan inoculasi *Toxoplasma gondii*

Pada penelitian ini, inoculasi mencit dilakukan dengan menggunakan isolat *Toxoplasma gondii* galur RH yang sudah dibuat stabil dengan penyimpanan pada suhu -70°C (=stabilat) isolat berasal dan stabilat milik Laboratorium Bioteknologi PAU Jogjakarta yang disimpan di laboratorum Hayati Universitas Gajah Mada Jogjakarta Diambil satu tabung stabilat yang bervolume 3 cc dan mengandung 3×10^7 tachizoit, dibagi menjadi 3 dosis masing-masing 1 cc berisi 10^7 tachizoit, disuntikkan secara intraperitoneal kepada 3 ekor mencit yang sudah disiapkan, dan diikuti perkembangannya setiap hari sampai tiba waktu panen yaitu 4 hari setelah penyuntikan. Bahan inoculan yang akan digunakan untuk perlakuan diperoleh dari hasil panen biakan pasase pertama dari isolat yang berasal dan stabilat. Oleh karena itu penyuntikan isolat dilakukan sedemikian rupa, sehingga saat panen yang direncanakan tersebut bertepatan dengan hari ke-9 kebuntingan mencit. Dan hasil panen tersebut, sebelum dilakukan perlakuan terlebih dulu jumlah tachizoit dihitung di dalam ruang hitung Neubauer oleh dua orang, yaitu peneliti dan asisten peneliti.

Hasil penghitungan tersebut adalah sebagai berikut

$$1. a) \text{ Penghitungan I } (32+25+34+30)/4 = 30,25 \times 10^4$$

$$b) \text{ Penghitungan II } (33+37+30+31)/4 = 33,75 \times 10^4$$

$$\text{Rata-rata} = (30,25+33,75)/2 = 32 \approx 30 \rightarrow = 30 \times 10^4$$

Dari cairan stok hasil bilasan peritoneum tersebut diambil $10 \mu\text{l} + 990 \mu\text{l}$ PBS

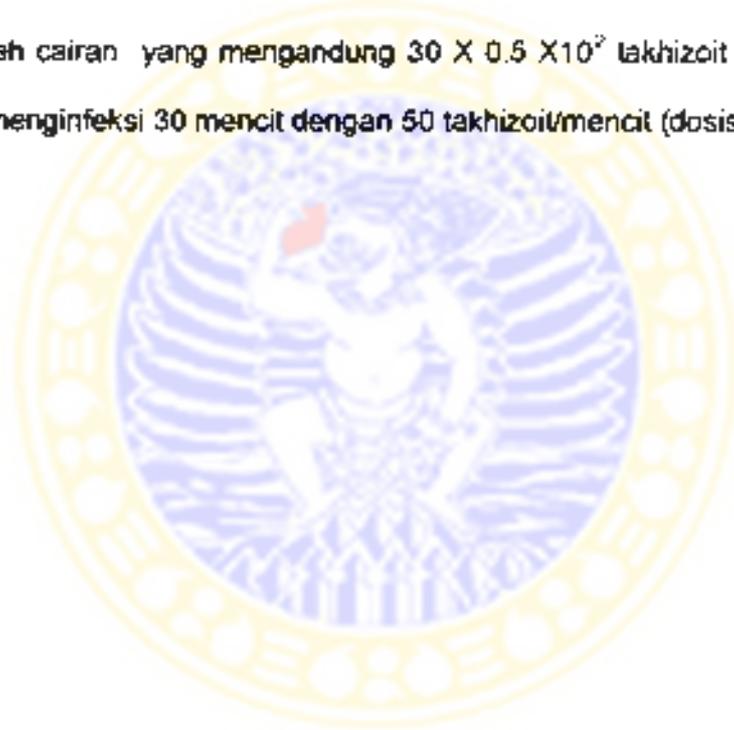
$$\begin{aligned} & 1 \text{ ml } (\approx 30 \times 10^7) \\ & \downarrow \\ & = 30 \times 10^7 \end{aligned}$$

jumlah ini sudah cukup untuk menginfeksi 30 mencit. masing-masing dengan dosis 100 takhizoit/ mencit (dosis 3)

2) dari cairan tersebut di atas diambil sebanyak 100 μ l berisi $30 \times 10^2 + 900 \mu$ l PBS = $30 \times 10^1 \rightarrow$ jumlah ini sudah cukup untuk menginfeksi 30 mencit dengan dosis 10 takhizoit/mencit. (dosis 1)

3) dan cairan stok diambil lagi 10 μ l berisi $30 \times 10^4 + 990 \mu$ l PBS
 \downarrow
 1 ml ($\approx 30 \times 10^2$)
 \downarrow
 $\approx 30 \times 10^2$

seperti pada 1), kemudian diambil lagi 500 μ l dan ditambah dengan 500 μ l PBS, maka diperoleh cairan yang mengandung $30 \times 0.5 \times 10^2$ takhizoit \rightarrow jumlah ini cukup untuk menginfeksi 30 mencit dengan 50 takhizoit/mencit (dosis 2).



Lampiran 4

Metoda sinkronisasi oestrus dan mengawinkan mencit

1. Dari stok mencit Balb/c yang ada di Pusvetma Wonocolo Surabaya dipilih 80 mencit betina yang berumur 4-6 bulan, berat badan sekitar 25-40 gram, sehat, sedang bunting (kebuntingan ke 1 atau 2) dengan usia kebuntingan kurang lebih sama, dan belum pernah terinfeksi oleh *Toxoplasma gondii*.
2. Mencit-mencit tersebut dibagi dalam 16 kandang yang masing-masing berisi 5 ekor mencit sesama betina dan dipisahkan di ruangan tersendiri yang jauh dari mencit jantan.
3. Setiap mencit diberi nomor/kode sesuai kandang masing-masing dengan metoda penomoran seperti yang diuraikan pada lampiran 1.
4. Setiap hari dilakukan pengamatan terhadap mencit-mencit di kandang masing-masing, dan bila ada yang melahirkan dicatat tanggal lahir dan jumlah anak yang dilahirkan.
5. Semua mencit ditunggu sampai melahirkan dan ditunggu sampai anak-anaknya siap disapih, yaitu sekitar 2-3 minggu.
6. Anak-anak mencit yang sudah siap sapih diambil dari kandang induknya, dan induk-induk mencit tetap dibiarkan berada di dalam kandang masing-masing selama 5-7 hari. Dengan cara ini maka mencit-mencit betina tersebut akan tetap dalam keadaan an-oestrus (*Lee-Boot effect*).
7. Pada hari yang sudah ditentukan dilakukan sinkronisasi oestrus dengan melakukan rangsangan *pheromone* yaitu dengan memasukkan sekam yang mengandung urine mencit jantan ke dalam kandang betina kemudian meletakkan kandang-kandang yang berisi mencit jantan tersebut disamping

- kandang yang berisi betina. Hal ini dimaksudkan untuk memangkitkan kembali siklus birahi yang sempat terhenti (*Pheromone effect*).
8. Pada hari ke 3 setelah rangsangan *pheromone*, diharapkan mencit-mencit betina tersebut sudah berada dalam kondisi oestrus (*Whitten effect*). Pada saat yang bersamaan masing-masing mencit betina dikandangkan secara berpasangan dengan pejantan yang sudah teruji kesuburannya di dalam kandang tersendiri selama 1 malam.
 9. Keesokan harinya semua pejantan diambil dan betina yang sudah dikawinkan dikembalikan ke kandang masing-masing yang berisi 5 ekor, sesuai dengan kelompok masing-masing. Hari tersebut dihitung sebagai H1 pasca kopulasi (p.k.)
 10. Pada hari ke 5 (H5 p.k.) mencit-mencit tersebut dibawa ke Jogjakarta dengan mobil ber AC pada jam 23.00 malam. Hal ini untuk mengurangi stress pada hewan-hewan tersebut.
 11. Sementara itu di laboratorum PAU Jogjakarta juga sudah dilakukan persiapan inokulan, yaitu dengan menginjeksikan stabilat yang masing-masing berisi 10^7 takhizoit kepada 3 ekor mencit yang disiapkan.
 12. Dengan perlakuan tersebut di atas maka diperhitungkan bahwa pada saat panen yaitu hari ke-4 pasca inokulasi (p.i.) bertepatan dengan H9 p.k., yaitu hari yang dijadwalkan untuk inokulasi ke hewan coba atau mencit yang sudah dikawinkan.
 13. Selanjutnya lihat bab 4.4.1.

Lampiran 5 .
Prosedur pemeriksaan IFN γ dengan kit ELISA

- a. Siapkan reagen sesaat sebelum digunakan dan campurkan reagen-reagen tersebut tanpa menimbulkan buih
- b. Tentukan jumlah baris sumuran yang diperlukan untuk tes, sesuai jumlah sample ditambah jumlah sumuran yang diperlukan untuk running blank dan standard. Setiap sample, blank dan standard dibuat duplo. Pindahkan Strip Sumuran tambahan yang telah dilapisi dengan Antibodi Monoklonal (tikus) terhadap IFN γ mencair dan tempatnya dan simpan dalam kantong foil secara kering dan rapat dalam suhu 2-8°C
- c. Cuci strip sumuran dua kali dengan lebih kurang 300 μ l **buffer pencuci** untuk setiap sumuran. Aspirasi seluruh isi sumuran di antara setiap pencucian, tetapi hati-hati jangan sampai menggores permukaan dasar sumuran. Setelah pencucian terakhir, kosongkan sumuran dan kenngkan strip di atas kertas penghisap atau serbet untuk menghilangkan sisa buffer pencuci. Gunakan strip sumuran sesegera mungkin setelah pencucian, atau letakkan dengan posisi sisi atas di bagian bawah di atas kertas/tissue pengering dalam waktu tidak lebih dari 15 menit. Jangan sampai sumuran kering!
- d. Tambah 100 μ l **Larutan Sampel** secara duplikat ke dalam seluruh sumuran standar. Siapkan larutan-larutan standar dengan memipet 100 μ l **mIFN γ Standar** yang telah disiapkan dalam duplikat ke dalam sumur A1 dan A2. Campurkan setiap isi sumuran A1 dan A2 dengan mengaspirasi dan menggerakkan berkali-kali dan pindahkan masing-masing 100 μ l ke dalam sumuran B1 dan B2. Hati-hati!

jangkan sampai menggores permukaan dalam sumuran. Ulangi prosedur ini sebanyak lima kali, sehingga diperoleh dua baris larutan mIFN γ standar dengan konsentrasi antara 1000 sampai 16 pg/ml. Buang 100 μ l dari isi sumuran terakhir (G1 dan G2)

Standard mIFN γ 100 μ l

A1	B1	C1	D1	E1	F1	G1	dibuang
----	----	----	----	----	----	----	---------

Diagram gambaran contoh susunan larutan blank, standar dan sampel di dalam lajur sumuran

	1	2	3	4
A	Standar 1 (1000 pg/ml)	Standar 1 (1000 pg/ml)	Sampel 1	Sampel 1
B	Standar 2 (500 pg/ml)	Standar 2 (500 pg/ml)	Sampel 2	Sampel 2
C	Standar 3 (250 pg/ml)	Standar 3 (250 pg/ml)	Sampel 3	Sampel 3
D	Standar 4 (125 pg/ml)	Standar 4 (125 pg/ml)	Sampel 4	Sampel 4
E	Standar 5 (63 pg/ml)	Standar 5 (63 pg/ml)	Sampel 5	Sampel 5
F	Standar 6 (32 pg/ml)	Standar 6 (32 pg/ml)	Sampel 6	Sampel 6
G	Standar 7 (16 pg/ml)	Standar 7 (16 pg/ml)	Sampel 7	Sampel 7
H	Blank	Blank	Sampel 8	Sampel 8

e. Tambah 100 μ l **Larutan Sampel** secara duplikat ke dalam sumuran blank

f. Tambah 50 μ l **Larutan Sampel** secara duplikat ke dalam sumuran sampel

- g. Tambah 50 μ l dari tiap **sample** dalam jumlah ganda/duplo, ke dalam sumuran yang sudah dirancang
- h. Siapkan **Konyugat-Biotin** (Lihat persiapan reagen)
- i. Tambah 50 μ l **Konyugat-Biotin** ke dalam semua sumuran, termasuk sumuran blank
- j. Tutup dengan **Penutup (plate cover)** dan inkubasi pada suhu kamar (18° - 25°C) selama 2 jam di atas *microplate shaker* yang diatur pada 200 rpm.
- k. Ambil plate cover dan sumuran-sumuran yang kosong. Cuci lajur-lajur sumuran sebanyak 3 kali seperti disebut pada point c dari petunjuk ini. Lanjutkan segera ke langkah berikutnya
- l. Siapkan **Streptavidin-HRP** (Lihat persiapan reagen)
- m. Tambahkan 100 μ l **Streptavidin-HRP** yang sudah diencerkan ke seluruh sumuran, termasuk blank
- n. Tutup dengan **Penutup (plate cover)** dan inkubasi pada suhu kamar (18° - 25°C) selama 2 jam di atas *microplate shaker* yang diatur pada 200 rpm.
- o. Siapkan larutan **TMB Substrate** beberapa menit sebelum digunakan (Lihat persiapan reagen)
- p. Ambil plate cover dan sumuran-sumuran yang kosong. Cuci lajur-lajur sumuran sebanyak 3 kali seperti disebut pada point c dari petunjuk ini. Lanjutkan segera ke langkah berikutnya
- q. Pipet 100 μ l campuran larutan Substrat TMB ke seluruh sumuran, termasuk blank
- r. Inkubasikan lajur-lajur sumuran pada suhu kamar (18° - 25° C) selama kurang lebih 10 menit di atas *microplate shaker* pada 200 rpm. Hindar paparan

langsung dengan cahaya. Saat di mana reaksi substrat harus dihentikan seringkali ditunjukkan oleh ELISA reader yang digunakan. Kebanyakan ELISA reader mencatat absorbance hanya sampai 2.0 O.D. Oleh karena itu perubahan warna pada masing-masing sumuran harus dilihat sendiri oleh orang yang melakukan pemeriksaan. Reaksi substrat harus segera dihentikan sebelum sumuran yang positif tidak lagi tercatat dengan baik.

s. Hentikan reaksi enzim dengan memipet secara cepat 100 µl **Stop Solution** ke dalam setiap sumuran, termasuk sumuran *blank*. Merupakan hal yang penting bahwa Stop Solution secara cepat tersebar dan merata ke seluruh sumuran untuk membuat enzim tidak aktif secara sempurna. Hasilnya harus dibaca sesegera mungkin setelah Stop Solution di tambahkan, atau dalam waktu tidak lebih dari satu jam bila lajur sumuran disimpan dalam suhu 2 - 8°C dalam gelap.

t. Baca absorbance dari tiap-tiap sumuran pada spektrofotometer dengan menggunakan panjang gelombang 450 nm sebagai panjang gelombang primer (biasanya 620 nm merupakan panjang gelombang yang banyak disebut dalam berbagai referensi, tetapi 610 – 650 nm masih memungkinkan). Kosongkan plate reader sesuai dengan petunjuk dari perusahaan kit dengan menggunakan sumuran blank. Tentukan absorbance dari keduanya, baik sample maupun standard IFNy.

Persiapan :**1. Pengenceran Standard mIFN γ .**

1.1 Standard m IFN- γ tambahkan 300 μ l dH₂O steril/filter

Buat pengenceran. → Siapkan ependorf:

Standard mIFN γ 100 μ l	A1	B1	C1	D1	E1	F1	G1	dibuang
---------------------------------------	----	----	----	----	----	----	----	---------

Tube 1 – 7 (A1 – G1) diisi dengan sample diluent (KIT) 100 μ l. ependorf
Setiap penambahan 1 – 7 (A1 –G1) di vortex

1.2 Buat duplo (2X/ulangan)

1.3 Siapkan sample serum dengan pengenceran A – G dengan sample diluent
(2X – 128X)

	1	2	3	4	5	6
	Standard	Standard	Sampel 1	Sampel 2	Sampel 3	Sampel 4
A	1000 pg/ml	1000 pg/ml	2 X	2 X	2 X	2 X
B	500 pg/ml	500 pg/ml	4 X	4 X	4 X	4 X
C	250 pg/ml	250 pg/ml	8 X	8 X	8 X	8 X
D	125 pg/ml	125 pg/ml	16 X	16 X	16 X	16 X
E	63 pg/ml	63 pg/ml	32 X	32 X	32 X	32 X
F	32 pg/ml	32 pg/ml	64 X	64 X	64 X	64 X
G	16 pg/ml	16 pg/ml	128 X	128 X	128 X	128 X
H	Blank	Blank				

Keterangan: Masukkan 100 μ l sample diluent sesuai urutan

Blank = 100 μ l sample diluent (kit)

Prosedur ELISA:

1. Cuci plate 2 X dengan **Wash Buffer** 300 μ l / sumuran
 Wash buffer : 50 μ l wash buffer + 950 μ l dH₂O steril = 1 liter
 (12.5 μ l wash buffer + 137.5 μ l dH₂O steril = 300 μ l)
2. Masukkan 100 μ l well standard / sample yang sudah dibuat pengenceran sesuai nomor urut (Blank dengan buffer dilucent 100 μ l)
3. Siapkan Assay Buffer. 2,5 ml Assay Buffer
 47,5 ml dH₂O steril = 50 ml
4. Siapkan Biotin conjugate: 30 μ l Biotin konjugat
 2,97 ml Assay Buffer
 30 μ l Green Dye
5. Masukkan 50 μ l sumuran Biotin konjugat yang sudah drsiapkan ke semua sumuran
6. Tutup dengan penutup yang tersedia dan inkubasi dengan shaker selama 2 jam pada suhu kamar (18-25°C)
7. Siapkan Streptavidin-HRP : 60 μ l Streptavidin HRP
 6 μ l Assay Buffer
 24 μ l Red O- Dye
8. Well strips dikosongkan dan dicuci 3 X dengan Wash buffer
9. Masukkan 100 μ l Streptavidin HRP pada masing-masing sumuran
10. Inkubasi (shaker) selama 1 jam pada suhu kamar
11. Siapkan larutan TMB substrat beberapa menit sebelum digunakan
1. Well strips dikosongkan dan dicuci 3 X dengan Wash buffer
2. Tambahkan larutan TMB substrat 100 μ l / well ke semua well (dalam ruang gelap)
3. Tutup dengan aluminium foil lalu inkubasikan dengan shaker selama 10 menit pada suhu kamar
4. Tambahkan 100 μ l Stop Solution
16. Dibaca dengan ELISA Reader dengan panjang gelombang 450 nm

Lampiran 6 a.

Prosedur pembuatan sediaan dan pengecatan imunohistokimia

Sediaan jaringan yang sudah diris dan ditempel di atas kaca benda



Lampiran 6 b.

Prosedur pembuatan sediaan jaringan dan pengecatan HE

1. Sediaan jaringan yang sudah diins dan ditempel di atas kaca benda
2. Direndam xylol panas 60-70° C sebanyak 2 x ± 15 menit
3. Direndam alkohol 94% 4 kali
4. Dibilas di bawah air mengalir selama ± 5 menit
5. Direndam dalam Hematoksin 3 -5 menit
6. Dibilas di bawah air mengalir selama ± 5 menit
7. Dicelup dalam Alkohol asam 1 kali celup (1 detik)
8. Dicelup dalam cairan Lithium Carbonat 1 kali celup
9. Dibilas di bawah air mengalir selama ± 5 menit
10. Direndam dalam Eosin 3-5 menit
11. Dicelup dalam Alkohol 96%. 3 kali
12. Dicoelup dalam Alkohol Absolut 1 kali
13. Dicoelup dalam Xylol, 2 kali
14. Ditunggu hingga kering, diben Entellan
15. Ditutup dengan *cover glass* dan diben labe

Lampiran 6 c.

Apoptag® In Situ Apoptosis Detection Kit Manual

Intergen Discovery Products. Intergen Company.

Protocols

Peroxidase Staining of Paraffin-Embedded Tissue

It is recommended that the following sections be read prior to beginning this procedure:

TECH NOTE # 4 : *methyl green*

TECH NOTE #11: *other pretreatments*

TECH NOTE #5: *double-labeling methods*

TECH NOTE #12: *sample handling*

TECH NOTE # 9: *Plastic cover slips*

TECH NOTE #13 *xylene*

TECH NOTE # 10: *Controls*

TECH NOTE # 14 *optional stopping points*

DO NOT ALLOW SAMPLES TO DRY OUT DURING PROCESSING

1. De-paraffinize Tissue Section (in a coplin jar)

- a. Wash the specimen in 3 changes of XYLENE for 5 min, each wash
- b. Wash the specimen in 3 changes of ABSOLUTE ETHANOL for 5 min, each wash
- c. Wash the specimen once in 95% ETHANOL and once in 70% ETHANOL for 3 min each wash
- d. Wash the specimen in one change of PBS for 5 min.

2. Pre-treat Tissue

- a. Apply freshly diluted PROTEIN DIGESTING ENZYME or PROTEINASE K (20 µg/ml) to the specimen for 15 min. at room temp. in a coplin jar or directly on the slide ($\approx 60\mu\text{l} / 5\text{ cm}^2$)
- b. Wash the specimen in 2 changes of dH₂O in a coplin jar for 2 min. each wash

3. Quench Endogenous Peroxidase

- a. Quench in 3.0% HYDROGEN PEROXIDE in PBS for 5 min. at room temp. (either on a slide or in a coplin jar)
- b. Rinse the specimen twice with PBS or water, for 5 min. each time in a coplin jar

4. Apply Equilibrium Buffer

- a. Gently tap off excess liquid and carefully blot or aspirate around section
- b. immediately apply 75 µl of EQUILIBRIUM BUFFER directly on the specimen
- c. incubate for at least 10 seconds at room temp. Refer to TECH NOTE # 14 *optional stopping points*

5. **Apply Working Strength TdT Enzyme**
 - a. Gently tap off excess liquid and carefully blot or aspirate around section
 - b. Immediately pipette on to the section of 55 μl / 5 cm^2 of WORKING STRENGTH TdT ENZYME
 - c. Incubate in a humidified chamber at 37°C for 1 hour

6. **Apply Stop/Wash Buffer**
 - a. Put the specimen in a coplin jar containing WORKING STRENGTH STOPWASH BUFFER, agitate for 15 seconds, and incubate for 10 min. at room temp
 - b. Remove an aliquot of ANTI-DIGOXIGENIN PEROXIDASE CONJUGATE from the stock vial sufficient to process the desired number of specimens. Warm the aliquot to room temp.

7. **Apply Anti-Digoxigenin conjugate**
 - a. Wash the specimen in 3 changes of PBS for 1 min. each wash
 - b. Gently tap off excess liquid and carefully blot and aspirate around the section
 - c. Apply room temperature ANTI-DIGOXENIN PEROXIDASE CONJUGATE to the slide; use about 65 μl /5 cm^2 of specimen surface area
 - d. Incubate in a humidified chamber for 30 min. at room temp.

8. **Wash in PBS**
 - a. Wash the specimen in 4 changes of PBS in a coplin jar for 2 min. per wash at room temp
 - b. While the slide is washing, prepare WORKING STRENGTH PEROXIDASE SUBSTRATE

9. **Develop Color in Peroxidase Substrate**
 - a. Gently tap off excess liquid and carefully blot or aspirate around the section
 - b. Apply enough PEROXIDASE SUBSTRATE to completely cover the specimen (75 μl 5 cm^2)
 - c. Stain for 3 to 6 min. at room temp. A humidified chamber is not required
 - d. In order to determine the optimal staining time, monitor color development by looking at the slide under the microscope

10. **Wash Specimen**
 - a. Wash the specimen in 3 changes of dH₂O in a coplin jar for 1 min. each wash (longer washing will not destain tissues)
 - b. Incubate the slide in dH₂O in a coplin jar for 5 min. at room temp

11. Counterstain Specimen

- a. Counterstain in 5.0% (w/v) METHYL GREEN in a coplin jar for 10 min. at room temp.
- b. Wash the specimen in 3 changes of dH₂O in a coplin jar, dipping the slide 10 times each in the first and second washes, followed by 30 sec. without agitation in the third wash
- c. Wash the specimen in 3 changes of 100% N-BUTANOL in a coplin jar, dipping the slide 10 times each in the first and second washes, followed by 30 sec. without agitation in the third wash

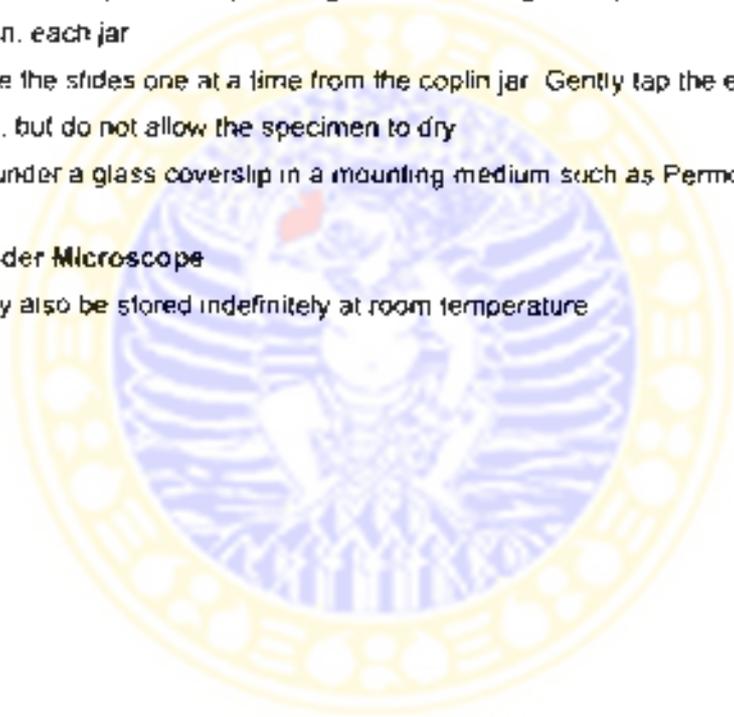
12. Mount Specimen (for specimens on silanized glass slides)

NOTE : Specimens on plastic supports must be viewed in other compatible mounting media. See TECH NOTE #17. Fixation using plastic supports

- a. Dehydrate the specimen by moving the slide through three jars of XYLENE, incubating for 2 min. each jar
- b. Remove the slides one at a time from the coplin jar. Gently tap the edge of the slide to drain, but do not allow the specimen to dry
- c. Mount under a glass coverslip in a mounting medium such as Permount

13. View Under Microscope

Slides may also be stored indefinitely at room temperature



Lampiran 7.

Prosedur penghitungan sel-sel apoptosis:

- 1 Penghitungan dilakukan terhadap semua slide yang ada, dengan nncian sbb.
 - a Jumlah mencit yang termasuk criteria masukan = 22 sampel
 - b Setiap mencit diambil 2 sampel jaringan uterus hamil. Dalam hal uterus kecil (diduga mengalami regresi sempurna) maka seluruh uterus diambil dan dibuat 2 sediaan, masing-masing komu dextra dan sinistra, sehingga berjumlah 44 sampel jaringan.
 - c Masing-masing sample jaringan dibuat 4 sediaan irisan, kemudian diwarnai dengan.
 - i Hematoksilin Eosin (HE)
 - ii. Apoptotag (IHC)
 - iii Caspase -3 (IHC)
 - iv IFN- γ (IHC)
 - d Slide yang diperiksa hanya yang diwarnai dengan HE. Apoptag dan caspase, sedang IFN- γ untuk saat ini tidak ikut diperiksa .
 - e Dengan demikian jumlah slide yang diperiksa berjumlah 44×3 warna = 132 slide
- 2 Semua slide yang sudah berkode, ditutup nomer kodenya dan diben nomor baru secara acak, sehingga pemerksa tidak mengetahui slide yang diperiksa milik sample yang mana (blinding)

3. Pemeriksa terdiri dari 3 orang (ahli patofogi anatomi dan brolog)
4. Pemeriksaan dan penghitungan sel dilakukan secara terpisah di antara ke -3 pemeriksa, disesuaikan dengan kemampuan / kesediaan waktu pemeriksa
5. Pemeriksaan dan penghitungan sel-sel dilakukan terhadap masing-masing slide pada bidang pandang di daerah feto-maternal junction, yaitu daerah yang ditandai dengan adanya sel-sel darah merah yang berinti (sisi fetal) dan tidak berinti (sisi maternal), dengan pembesaran 1000 X, masing-masing sebanyak 20 lapangan pandang., dengan pedoman diagnosis sel-sel apoptotic terlampir.
6. Hasil penghitungan sel-sel untuk setiap lapangan pandang sesuai dengan slide yang diperiksa ditulis di lembar kerja pada kotak yang sesuai, dan hasil akhirnya dijumlah pada kotak kanan bawah.
7. Untuk sediaan dengan pengecatan HE juga dihitung sel-sel yang mengalami nekrosis
8. Dimungkinkan terjadi perbedaan hasil penghitungan yang menyolok di antara ke tiga pemeriksa untuk satu slide yang sama, karena daerah yang dihitung mungkin berbeda. Dalam hal demikian maka dilakukan penghitungan ulang dengan memastikan daerah penghitungan yang sama
9. Hasil penghitungan direkap dan nomor slide dikembalikan ke nomor kode bila seluruh proses penghitungan sudah selesai.
10. Analisis statistic dilakukan bila semua hasil sudah dikembalikan ke nomor kode .

LEMBAR KERJA							
PENGHITUNGAN JUMLAH SEL-SEL APOPTOSIS							
Tanggal :		Nomor slide:		Pemeriksa : 1 / 2 / 3			
TROFOBLAS				DESIDUA			
Pengecatan : HEMATOKSILIN EOSIN				Pengecatan : HEMATOKSILIN EOSIN			
Jml pd msg-2 lapangan hitung		Total		Jml pd msg-2 lapangan hitung		Total	
Jumlah total sel-sel apoptotik				Jumlah total sel-sel apoptotik			
APOPTOTAG				APOPTOTAG			
Jml pd msg-2 lapangan hitung		Total		Jml pd msg-2 lapangan hitung		Total	
Jumlah total sel-sel apoptotik				Jumlah total sel-sel apoptotik			
CASPASE -3				CASPASE -3			
Jml pd msg-2 lapangan hitung		Total		Jml pd msg-2 lapangan hitung		Total	
Jumlah total sel-sel apoptotik				Jumlah total sel-sel apoptotik			

Lampiran 9 : Analisis Statistik

Oneway

Descriptives

Dependent variables	D O S I s	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
						Lower Bound	Upper Bound		
JNN	0	3	10,33	2,31	1,33	4,60	16,07	9	13
	10	4	12,00	2,31	1,15	8,33	15,67	10	14
	50	4	12,50	,58	,29	11,58	13,42	12	13
	100	6	9,00	3,90	1,59	4,91	13,09	4	12
	Total	17	10,76	2,97	,72	9,24	12,29	4	14
tottakHz	0	3	,00	,00	,00	,00	,00	0	0
	10	4	6250,00	1443,38	721,69	3953,27	8546,73	5000	7500
	50	4	13750,00	1443,38	721,69	11453,27	16046,73	12500	15000
	100	6	15833,33	1290,99	527,05	14478,52	17188,15	15000	17500
	Total	17	10294,12	6304,91	1529,16	7052,43	13535,80	0	17500
IFG_ng/ml	0	3	,23568	3,2717E-03	1,8889E-03	,22755	,24381	,232	,238
	10	4	,14807	5,4078E-02	2,7039E-02	6,2016E-02	,23412	,101	,195
	50	4	,17340	1,2894E-02	6,4471E-03	,15288	,19392	,162	,185
	100	6	,15323	8,8638E-02	3,6186E-02	6,0214E-02	,24625	,047	,244
	Total	17	,17131	6,3809E-02	1,5476E-02	,13850	,20412	,047	,244
TRF_CSP	0	2	86,50	27,58	19,50	-161,27	334,27	67	106
	10	2	79,50	47,38	33,50	-346,16	505,16	46	173
	50	4	91,50	56,00	28,03	-27,71	150,71	12	134
	100	6	350,17	503,49	205,55	-178,21	878,55	14	1000
	Total	14	191,36	344,82	92,16	-7,74	390,45	12	1000
DCD_CSP	0	2	30,00	,00	,00	30,00	30,00	30	30
	10	2	44,00	32,53	23,00	248,24	336,24	21	67
	50	4	43,75	41,68	20,84	-22,57	110,07	4	89
	100	6	17,17	13,92	5,68	2,56	31,77	3	39
	Total	14	30,43	26,85	7,18	14,93	45,93	3	89

	0	3	335,67	68,97	39,82	164,35	508,99	260	395
	10	4	253,00	132,31	66,15	42,47	463,53	130	435
TRF_HE	50	4	301,25	70,36	35,18	189,29	413,21	227	392
	100	6	617,83	420,64	171,72	176,40	1059,26	177	1000
	Total	17	407,71	294,01	71,31	256,54	558,87	130	1000
	0	3	90,00	53,67	30,99	-43,34	223,34	39	146
	10	4	105,25	34,51	17,25	50,34	160,16	72	137
DCD_HE	50	4	102,00	37,48	18,74	42,36	161,64	74	157
	100	6	105,00	60,49	24,70	41,52	168,48	49	202
	Total	17	101,71	44,98	10,91	78,58	124,83	39	202
	0	2	284,00	148,49	105,00	-1050,15	1618,15	179	389
	10	2	212,00	7,07	5,00	148,47	275,53	207	217
TRF_APT	50	4	305,75	116,36	58,18	120,60	490,90	152	430
	100	6	570,83	476,09	194,36	71,21	1070,45	12	1000
	Total	14	402,66	340,15	90,91	206,46	599,25	12	1000
	0	2	124,50	53,03	37,50	-351,98	600,98	87	162
	10	2	136,00	33,94	24,00	-168,95	440,95	112	160
DCD_APT	50	4	62,50	57,77	28,88	-9,42	174,42	5	143
	100	6	48,00	31,09	12,69	13,38	78,62	4	91
	Total	14	80,50	52,62	14,06	50,12	110,88	4	162

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
JNN	Between Groups	37,392	3	12,464	1,583	,246
	Within Groups	103,667	13	7,974		
	Total	141,059	16			
tottakhiz	Between Groups	615196078,431	3	205065359,477	127,961	,000
	Within Groups	20833333,333	13	1602564,103		
	Total	636029411,765	16			
IFG_ng/ml	Between Groups	1,657E-02	3	5,523E-03	1,478	,266
	Within Groups	4,858E-02	13	3,737E-03		
	Total	6,515E-02	16			

TRF_CSP	Between Groups	265788.381	3	88596,127	,692	.577
	Within Groups	1279946,833	10	127994,683		
	Total	1545735,214	13			
DCD_CSP	Between Groups	2133,845	3	711,282	,983	,439
	Within Groups	7237,583	10	723,758		
	Total	9371,429	13			
TRF_HE	Between Groups	421557,279	3	140519,093	1,900	,180
	Within Groups	961550,250	13	73965,404		
	Total	1383107,529	16			
DCD_HE	Between Groups	526,779	3	175,593	,072	,974
	Within Groups	31844,750	13	2449,596		
	Total	32371,529	16			
TRF_APT	Between Groups	308122,131	3	102707,377	,859	,494
	Within Groups	1196005,583	10	119600,568		
	Total	1504127,714	13			
DCD_APT	Between Groups	17190,000	3	5730,000	3,047	,079
	Within Groups	18807,500	10	1880,750		
	Total	35997,500	13			

Post Hoc Tests
Multiple Comparisons
Tukey HSD

Dependent Variable	(I) DOSIS	(J) DOSIS	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
JNN	0	10	-1,67	2,16	,865	-8,00	4,66
		50	-2,17	2,16	,750	-8,50	4,16
		100	1,33	2,00	,907	-4,53	7,19

	0	1,67	2,16	,865	-4,66	8,00
10	50	-.50	2,00	,994	-6,36	5,36
	100	3,00	1,82	,389	-2,35	8,35
	0	2,17	2,16	,750	-4,16	8,50
50	10	,50	2,00	,994	-5,36	6,36
	100	3,50	1,82	,267	-1,85	8,85
	0	-1,33	2,00	,907	-7,19	4,53
100	10	-3,00	1,82	,389	-8,35	2,35
	50	-3,50	1,82	,267	-8,85	1,85
	10	-6250,00(*)	966,87	,000	-9087,88	-3412,12
0	50	-13750,00(*)	966,87	,000	-16587,88	-10912,12
	100	-15833,33(*)	895,14	,000	-18460,70	-13205,96
	0	6250,00(*)	966,87	,000	3412,12	9087,88
10	50	-7500,00(*)	895,14	,000	-10127,37	-4872,63
	100	-9583,33(*)	817,15	,000	-11981,78	-7184,88
100	0	13750,00(*)	966,87	,000	10912,12	16587,88
50	10	7500,00(*)	895,14	,000	4872,63	10127,37
	100	-2083,33	817,15	,098	-4481,78	315,12
	0	15833,33(*)	895,14	,000	13205,96	18460,70
100	10	9583,33(*)	817,15	,000	7184,88	11981,78
	50	2083,33	817,15	,098	-315,12	4481,78
IFG_ng/ml	10	8,7611E-02	4,6688E-02	,284	-4,94232E-02	,22466
0	50	6,2278E-02	4,6688E-02	,559	-7,47565E-02	,19931
	100	8,2444E-02	4,3224E-02	,272	-4,44247E-02	,20931
	0	-8,76111E-02	4,6688E-02	,284	-.22465	4,9423E-02
10	50	-2,53333E-02	4,3224E-02	,935	-.15220	,10154
	100	-5,16667E-03	3,9458E-02	,999	-.12098	,11065
50	0	-6,22778E-02	4,6688E-02	,559	-.19931	7,4757E-02

	10	2.5333E-02	4.3224E-02	.935	.10154	.15220
	100	2.0167E-02	3.9458E-02	.955	9.5648E-02	.13598
	0	-6.24444E-02	4.3224E-02	.272	-.20931	4.4425E-02
100	10	5.1667E-03	3.9458E-02	.999	-.11065	.12098
	50	-2.01667E-02	3.9458E-02	.955	-.13598	9.5648E-02
	10	7.00	357.76	1.000	-1087.54	1101.54
0	50	25.00	309.83	1.000	-922.90	972.90
	100	-263.67	292.11	.804	-1157.35	630.02
	0	-7.00	357.76	1.000	-1101.54	1087.54
10	50	18.00	309.83	1.000	-929.90	965.90
TRF_CSP	100	-270.67	292.11	.792	-1164.35	623.02
	0	-25.00	309.83	1.000	-972.90	922.90
50	10	-18.00	309.83	1.000	-965.90	929.90
	100	-288.67	230.94	.612	-995.19	417.86
	0	263.67	292.11	.804	-630.02	1157.35
100	10	270.67	292.11	.792	-623.02	1164.35
	50	288.67	230.94	.612	-417.86	995.19
	10	-14.00	26.90	.952	-68.31	68.31
0	50	-13.75	23.30	.933	-57.53	57.53
	100	12.83	21.97	.935	-54.37	80.04
	0	14.00	26.90	.952	-68.31	68.31
10	50	.25	23.30	1.000	-71.03	71.53
DCD_CSP	100	26.83	21.97	.628	-40.37	94.04
	0	13.75	23.30	.933	-57.53	85.03
50	10	-.25	23.30	1.000	-71.53	71.03
	100	26.58	17.37	.456	-26.55	79.71
	0	-12.83	21.97	.935	-80.04	54.37
100	10	-26.83	21.97	.628	-94.04	40.37
	50	-26.58	17.37	.456	-79.71	26.55

		10	82,67	207,72	,978	-527,01	692,35
	0	50	34,42	207,72	,998	-575,26	644,10
		100	-282,17	192,31	,483	-846,62	282,29
		0	-82,67	207,72	,978	-692,35	527,01
	10	50	-48,25	192,31	,994	-612,70	516,20
TRF_HE		100	-364,83	175,55	,211	-880,11	150,44
		0	-34,42	207,72	,998	-644,10	575,26
	50	10	48,25	192,31	,994	-516,20	612,70
		100	-316,58	175,55	,315	-831,86	198,69
		0	282,17	192,31	,483	-282,29	846,62
	100	10	364,83	175,55	,211	-150,44	880,11
		50	316,58	175,55	,315	-198,69	831,86
		10	-15,25	37,80	,977	-126,20	95,70
	0	50	-12,00	37,80	,988	-122,95	98,95
		100	-15,00	35,00	,973	-117,72	87,72
		0	15,25	37,80	,977	-95,70	126,20
	10	50	3,25	35,00	1,000	-99,47	105,97
OCD_HE		100	,25	31,95	1,000	-93,52	94,02
		0	12,00	37,80	,988	-98,95	122,95
	50	10	-3,25	35,00	1,000	-105,97	99,47
		100	-3,00	31,95	1,000	-96,77	90,77
		0	15,00	35,00	,973	-87,72	117,72
	100	10	-2,25	31,95	1,000	-94,02	93,52
		50	3,00	31,95	1,000	-90,77	96,77
TRF_APT		10	72,00	345,83	,997	-988,04	1130,04
	0	50	-21,75	299,50	1,000	-938,04	894,54
		100	-286,83	282,37	,744	-1150,72	577,06
		0	-72,00	345,83	,997	-1130,04	888,04
	10	50	-93,75	299,50	,989	-1010,04	822,54
		100	-358,83	282,37	,600	-1222,72	505,06
	50	0	21,75	299,50	1,000	-894,54	938,04
		10	93,75	299,50	,989	-822,54	1010,04

		100	-265,08	223,23	,648	948,05	417,88
		0	286,83	287,37	,744	-577,05	1150,72
	100	10	358,83	282,37	,600	505,05	1722,72
		50	265,08	223,23	,648	-417,88	948,05
		10	-11,50	43,37	,993	144,18	121,18
	0	50	47,03	37,56	,687	-72,90	156,90
		100	78,50	35,41	,184	-79,83	186,83
		0	11,50	43,37	,993	-121,18	144,18
	10	50	53,50	37,56	,513	-61,40	168,40
		100	90,00	35,41	,113	-18,33	198,33
DCD_APT		0	-42,00	37,56	,687	-156,90	72,90
	50	10	-53,50	37,56	,513	-168,40	61,40
		100	36,50	27,99	,581	-49,14	122,14
		0	-78,50	35,41	,184	-186,83	29,83
	100	10	-90,00	35,41	,113	-198,33	18,33
		50	-36,50	27,99	,581	-122,14	49,14

* The mean difference is significant at the .05 level.

Homogeneous Subsets

		JNN Tukey HSD		tottakhiz Tukey HSD				
		Subset for alpha = .05		Subset for alpha = .05				
DOSIS	N	1		DOSIS	N	1	2	3
100	6	9,00		0	3	,00		
0	3	10,33		10	4	6250,00		
10	4	12,00		50	4		13750,00	
50	4	12,50		100	6		15833,33	
Sig.		,338		Sig.		1,000	1,000	,142

IFG_ng/ml
Tukey HSD

Subset for alpha = .05

DOSIS	N	1
10	4	,14807
100	6	,15323
50	4	,17340
0	3	,23568
Sig.		,228

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a Uses Harmonic Mean Sample Size = 4,000.

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

TRF_CSP Tukey HSD			DCD_CSP Tukey HSD		
Subset for alpha = .05			Subset for alpha = .05		
DOSIS	N	1	DOSIS	N	1
50	4	61,50	100	6	17,17
10	2	79,50	0	2	30,00
0	2	86,50	50	4	43,75
100	6	350,17	10	2	44,00
Sig.		,775	Sig.		,649

TRF_HE Tukey HSD			DCD_HE Tukey HSD		
Subset for alpha = .05			Subset for alpha = .05		
DOSIS	N	1	DOSIS	N	1
10	4	253,00	0	3	90,00
50	4	301,25	50	4	102,00
0	3	335,67	100	6	105,00
100	6	617,83	10	4	105,25
Sig.		,276	Sig.		,971

TRF_APT Tukey HSD			DCD_APT Tukey HSD		
Subset for alpha = .05			Subset for alpha = .05		
DOSIS	N	1	DOSIS	N	1
10	2	212,00	100	6	46,00
0	2	284,00	50	4	82,50
50	4	305,75	0	2	124,50
100	6	570,83	10	2	136,00
Sig.		,622	Sig.		,127

Means for groups in homogeneous subsets are displayed

a Uses Harmonic Mean Sample Size = 2,824

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

Oneway Descriptives

95% Confidence Interval
for Mean

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	Lower Bound	Upper Bound	Minimum	Maximum	
JNN	0	5	10,40	1,52	,68	8,52	12,28	9	12
	10	10	8,00	1,76	,56	6,74	9,26	5	10
	50	6	7,33	4,93	2,01	2,16	12,50	1	11
	100	8	4,32	4,48	1,59	,57	8,07	0	9
	Total	29	7,26	3,89	,72	5,78	8,74	0	12
tottakhiz	0	5	,00	,00	,00	,00	0	0	
	10	10	18822500,00	18596142,37	5880616,56	5519621,13	32125378,87	157500	41500000
	50	6	57250000,00	12467958,93	5090022,92	44165679,54	70334320,46	46500000	73000000
	100	8	79750000,00	17015749,01	6015975,78	65524477,83	93975522,17	59500000	101250000
	Total	29	40335344,83	34238568,18	6357942,50	27311690,01	53358999,65	0	101250000
IFG_ng/ml	0	5	,34163	5,9096E-02	2,6428E-02	,26826	,41501	,290	,405
	10	10	1,64897	1,40613	,44466	,64308	2,65485	,146	3,418
	50	6	9,21179	,12548	5,1228E-02	3,08010	3,34348	3,095	3,367
	100	8	3,08057	,24387	8,6257E-02	2,87680	3,28453	2,783	3,400
	Total	29	2,14183	1,34769	,25028	1,62820	2,65447	,146	3,418
TRF_CSP	0	5	70,20	27,68	12,38	35,83	104,57	47	114
	10	10	72,60	46,06	14,56	39,65	105,55	3	139
	50	6	357,00	498,18	203,38	-185,81	879,81	22	1000
	100	8	521,88	511,19	180,73	94,51	949,24	28	1000
	Total	29	254,97	388,58	72,16	107,16	402,77	3	1000
DCD_CSP	0	5	42,40	32,97	14,75	1,46	83,34	16	99
	10	10	41,20	25,52	8,07	22,96	59,45	2	73
	50	6	27,83	39,39	16,08	-13,50	69,17	3	107
	100	8	26,88	18,89	6,68	11,09	42,66	5	62
	Total	29	34,69	28,00	5,20	24,04	45,34	2	107
TRF_HE	0	5	235,80	122,16	54,63	84,11	387,49	100	414
	10	10	315,40	264,59	83,67	126,12	504,68	104	1000

	50	6	529.83	376.57	153.73	134.65	925.01	123	1000
	100	8	638.63	390.69	138.13	312.00	965.25	154	1000
	Total	29	435.21	337.76	62.72	306.73	563.68	100	1000
DGD_HE	0	5	62.40	26.69	11.94	29.26	95.54	26	103
	10	10	146.10	301.10	85.22	-69.29	367.49	9	1000
	50	6	97.00	40.51	16.54	54.49	139.51	39	152
	100	8	274.38	299.33	105.83	24.13	524.62	69	1000
	Total	29	156.90	241.42	44.83	65.07	248.73	9	1000
TRF_APT	0	5	206.20	91.45	40.90	92.66	319.74	110	340
	10	10	185.00	101.13	31.98	112.66	257.34	63	360
	60	6	454.50	426.70	174.20	6.71	902.29	110	1000
	100	8	605.13	429.90	151.99	245.72	964.53	89	1000
	Total	29	360.31	342.70	63.64	229.96	490.67	63	1000
DGD_APT	0	5	45.40	32.79	14.66	4.68	86.12	11	83
	10	10	66.70	43.41	13.73	35.65	97.75	3	141
	50	6	39.00	17.64	7.20	20.49	57.51	15	82
	100	8	158.75	343.60	121.48	-128.51	446.01	0	1000
	Total	29	82.69	180.92	33.60	13.87	151.51	0	1000

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
JNN	Between Groups	123,887	3	41,296	3,450	.032
	Within Groups	299,223	25	11,969		
	Total	423,109	28			
tottakhiz	Between Groups	26907478834051730,000	3	8969159611350580,000	37,900	.000
	Within Groups	5916348600000000,000	25	236653944000000,000		
	Total	32823827434051730,000	28			

	Between Groups	32,551	3	10,850	14,820	,000
IFG_ng/ml	Within Groups	18,304	25	,732		
	Total	50,856	28			
	Between Groups	1135654,891	3	378551,630	3,060	,047
TRF_CSP	Within Groups	3092262,075	25	123690,483		
	Total	4227916,966	28			
	Between Groups	1491,699	3	497,233	,607	,616
DCD_CSP	Within Groups	20462,508	25	818,500		
	Total	21954,207	28			
	Between Groups	727108,850	3	242369,617	2,456	,087
TRF_HE	Within Groups	2467229,908	25	98689,196		
	Total	3194338,759	28			
	Between Groups	177748,715	3	59249,572	1,019	,401
DCD_HE	Within Groups	1454169,975	25	58166,799		
	Total	1631918,690	28			
	Between Groups	958791,032	3	319597,011	3,430	,032
TRF_APT	Within Groups	2329555,175	25	93182,207		
	Total	3288346,207	28			
	Between Groups	67243,407	3	22414,469	,660	,584
DCD_APT	Within Groups	849252,800	25	33970,112		
	Total	916496,207	28			

Post Hoc Tests
Multiple Comparisons
Tukey HSD

95% Confidence Interval

Dependent Variable	(I) DOSIS	(J) DOSIS	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	Lower Bound	Upper Bound
JNN	0	10	2.40	1.89	.592	-.281	7.61
		50	3.07	2.09	.473	-.270	6.83
		100	5.08(*)	1.97	.024	.05	11.50
	10	0	2.40	1.89	.592	-.701	2.81
		50	.67	1.79	.982	-.425	5.58
		100	3.68	1.64	.140	.84	6.19
	50	0	-3.07	2.09	.473	-.883	2.70
		10	-.67	1.79	.982	-.558	4.25
		100	3.01	1.87	.390	-.213	6.15
	100	0	5.08(*)	1.97	.024	1.150	.65
		10	-3.68	1.64	.140	-.819	.84
		50	-3.01	1.87	.390	-.815	2.13
tottakhlz	0	10	-18822500.00	8425923.28	.142	-41999465.29	4354465.29
		50	-57250000.00(*)	9315208.68	.000	-82873099.21	-31626900.79
		100	-79750000.00(*)	8769979.01	.000	-103873350.31	-55626649.69
	10	0	18822500.00	8425923.28	.142	-4354465.29	41999465.29
		50	-38427500.00(*)	7944036.66	.000	-60278952.43	-16576047.57
		100	-60927500.00(*)	7297063.61	.000	-80999340.72	-40855659.28
	50	0	57250000.00(*)	9315208.68	.000	31626900.79	82873099.21
		10	38427500.00(*)	7944036.66	.000	16576047.57	60278952.43
		100	-22500000.00	8308072.40	.055	-45352795.96	352795.96
	100	0	79750000.00(*)	8769979.01	.000	55626649.69	103873350.31
		10	60927500.00(*)	7297063.61	.000	40855659.28	80999340.72
		50	22500000.00	8308072.40	.055	-352795.96	45352795.96
IFG_ng/ml	0	10	1.30733(*)	46867	.045	-.259549	-1,81784E-02
		50	-1.87016(*)	51813	.000	-4.29537	1,44494

	100	-2.73893(*)	.48781	.000	-4.08073	-1.39714
	0	1.30733(*)	.46867	.046	1.8178E-02	2.59649
10	50	-1.56282(*)	.44187	.008	-2.77825	-.34740
	100	-1.43160(*)	.40588	.008	-2.54804	-.31516
	0	2.87016(*)	.51813	.000	1.44454	4.29537
50	10	1.56282(*)	.44187	.008	.34740	2.77825
	100	.13122	.46211	.992	-1.13990	1.40235
	0	2.73893(*)	.48781	.000	1.39714	4.08073
100	10	1.43160(*)	.40588	.008	.31516	2.54804
	50	-.13122	.46211	.982	-1.40235	1.13990
	10	-2.40	.19263	1.000	-.53227	527.47
0	50	-288.80	.21296	.543	-.87259	298.99
	100	-451.68	.20050	.137	-1003.18	99.83
	0	2.40	.19263	1.000	-.52747	532.27
10	50	-284.40	.18162	.415	-.78396	215.16
	100	-449.28	.16682	.057	-.90815	9.60
TRF_CSP	0	288.80	.21296	.543	-.29899	872.59
50	10	284.40	.18162	.415	-.21516	783.96
	100	-164.88	.18994	.821	-.68733	357.58
	0	451.68	.20050	.137	-.9983	1003.18
100	10	-449.28	.16682	.057	-.960	908.15
	50	164.88	.18994	.821	357.58	687.33
DCD_CSP	10	1.20	.1567	1.000	-.4190	44.30
0	50	14.57	.1732	.835	-.8222	62.22
	100	15.52	.1631	.777	-.2934	60.39
	0	-1.20	.1567	1.000	-.4430	41.90
10	50	13.37	.1477	.802	-.2727	54.00
	100	14.33	.1357	.719	-.2300	51.65
	0	-14.57	.1732	.835	-.8222	33.09
50	10	-13.37	.1477	.802	-.5400	27.27
	100	.96	.1545	1.000	-.4154	43.46
100	0	-15.52	.1631	.777	-.8039	29.34
	10	-14.33	.1357	.719	-.5165	23.00

	50	- 96	15.45	1.000	-43.46	41.54
	10	-79.60	172.07	.966	-552.90	393.70
0	50	-294.03	190.23	.427	-817.28	229.22
	100	-402.83	179.09	.138	-895.45	89.80
	0	79.60	172.07	.966	-393.70	552.90
10	50	-214.43	162.23	.558	-660.66	231.80
	100	-323.23	149.01	.160	-733.11	86.66
TRF_HE	0	294.03	190.23	.427	-229.22	817.28
	50	214.43	162.23	.558	-231.80	660.66
	100	-108.79	169.66	.918	-575.47	357.89
	0	402.83	179.09	.138	-89.80	895.45
100	10	323.23	149.01	.160	-86.66	733.11
	50	108.79	169.66	.918	-357.89	575.47
	10	-83.70	132.10	.920	-447.06	279.66
0	50	-34.60	146.04	.895	-436.31	367.11
	100	-211.98	137.49	.429	-590.17	166.22
	0	83.70	132.10	.920	-279.66	447.06
10	50	49.10	124.54	.979	-293.48	391.68
	100	-128.28	114.40	.680	-442.95	186.40
DCD_HE	0	34.60	146.04	.895	-367.11	436.31
	50	-49.10	124.54	.979	-391.68	293.48
60	100	-177.38	130.25	.534	-535.65	180.90
	0	211.98	137.49	.429	-166.22	590.17
100	10	128.28	114.40	.680	-186.40	442.95
	50	177.38	130.25	.534	-180.90	535.65
TRF_APT	10	21.20	167.20	.999	-438.70	481.10
0	50	-248.30	184.84	.545	-756.74	260.14
	100	-398.93	174.02	.127	-877.61	79.76
	0	-21.20	167.20	.999	-481.10	438.70
10	50	-269.50	157.83	.340	-703.10	164.10
	100	-420.13(*)	144.80	.036	-816.41	-21.84
50	0	248.30	184.84	.545	-260.14	756.74
	10	269.50	157.83	.340	-164.10	703.10

DCD_APT	Dosis	N	JNN		Tottakhiz		
			Mean	SD	Mean	SD	
100	100	8	-150,63	164,86	,798	-604,10	302,85
	0	5	398,93	174,02	,127	-79,76	877,61
	10	10	420,13(*)	144,80	,036	21,84	818,41
	50	6	150,63	164,86	,798	-302,85	604,10
	10	10	-21,30	100,95	,997	-288,98	256,38
	0	5	6,40	111,61	1,000	-300,59	313,39
	100	8	-113,35	105,07	,705	-402,37	175,67
	0	5	21,30	100,95	,997	-256,38	298,98
	10	10	27,70	95,18	,991	-234,10	289,50
	100	8	-92,05	87,43	,720	-332,53	148,43
	0	5	-6,40	111,61	1,000	-313,39	300,59
	50	6	-27,70	95,18	,991	-289,50	234,10
50	100	8	-119,75	99,54	,631	-393,55	154,05
	0	5	113,35	105,07	,705	-175,67	402,37
	10	10	92,05	87,43	,720	-148,43	332,53
	50	6	119,75	99,54	,631	-154,05	393,55

* The mean difference is significant at the .05 level.

Homogeneous Subsets

DOSIS	N	JNN Tukey HSD		Tottakhiz Tukey HSD		
		1	2	1	2	
100	8	4,32		0	5	,00
50	6	7,33	7,33	10	10	18822500,00
10	10	8,00	8,00	50	6	57250000,00
0	5		10,40	100	8	79750000,00
Sig.		,232	,381	Sig.		,138
						,057

IFG_ng/ml
Tukey HSD

Subset for alpha = .05

DOSIS	N	1	2	3
0	5	.34163		
10	10		1.64897	
100	8			3.08057
50	6			3.21179
Sig.		1.000	1.000	.992

TRF_CSP
Tukey HSD

DCD_CSP
Tukey HSD

Subset for alpha = .05

DOSIS	N	1	DOSIS	N	1
0	5	70,20	100	8	26,88
10	10	72,60	50	6	27,83
50	6	357,00	10	10	41,20
100	8	521,88	0	5	42,40
Sig.		.111	Sig.		.752

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a Uses Harmonic Mean Sample Size = 6.761.

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

TRF_HE Tukey HSD			DCD_HE Tukey HSD		
Subset for alpha = .05			Subset for alpha = .05		
DOSIS	N	1	DOSIS	N	1
0	5	235,80	0	5	62,40
10	10	315,40	50	6	97,00
50	6	529,83	10	10	146,10
100	8	638,63	100	8	274,38
Sig.		.112	Sig.		.388

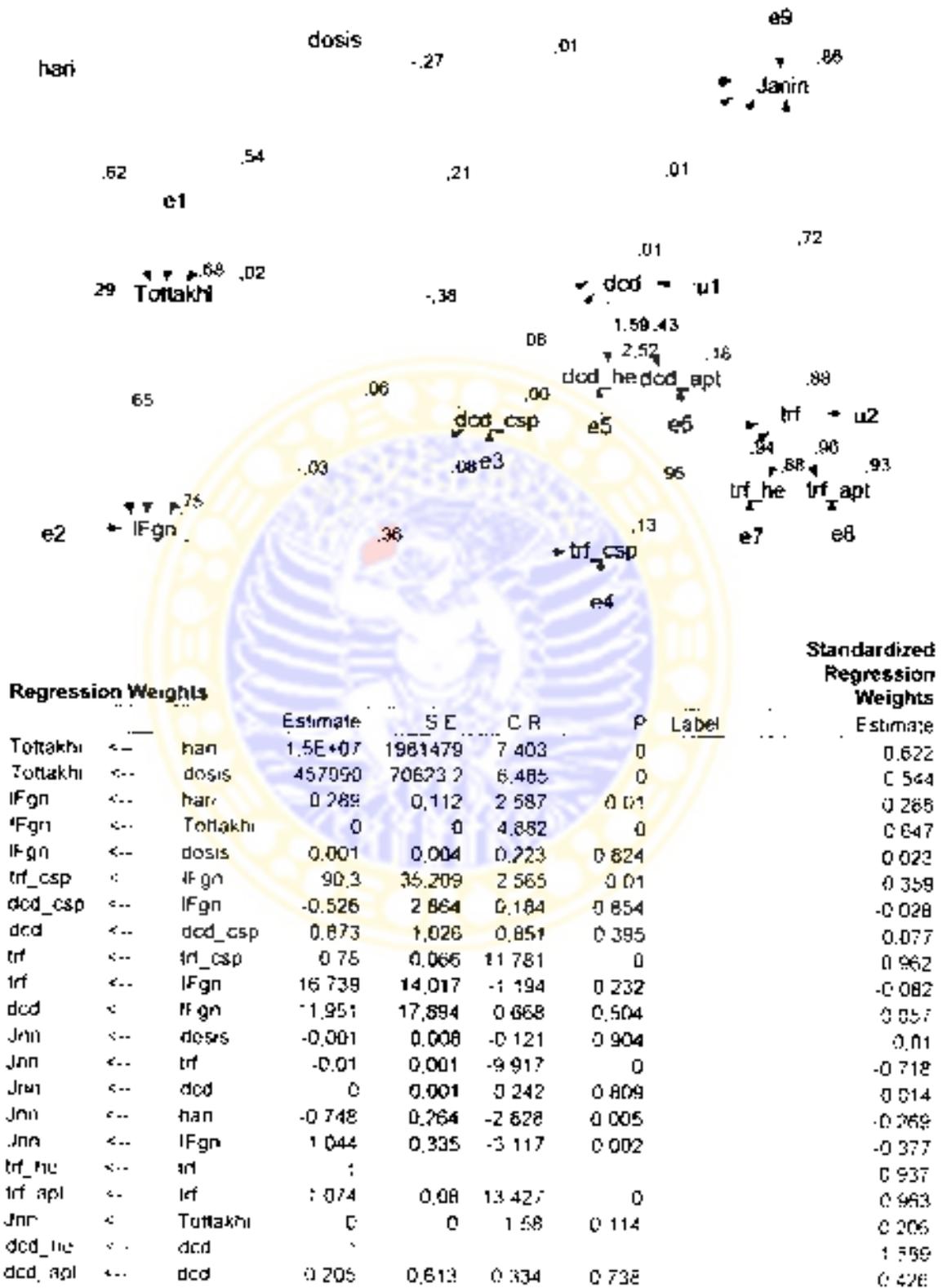
TRF_APT Tukey HSD			DCD_APT Tukey HSD		
Subset for alpha = .05			Subset for alpha = .05		
DOSIS	N	1	DOSIS	N	1
10	10	185,00	50	6	39,00
0	5	206,20	0	5	45,40
50	6	454,50	10	10	66,70
100	8	605,13	100	8	158,75
Sig.		.079	Sig.		.636

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a Uses Harmonic Mean Sample Size = 6.761.

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

Gambar dan hasil analisis jalur
Pengaruh toxoplasmosis terhadap jumlah janin pada mencit



Standardized Total Effects - Estimates									Squared Multiple Correlations
	han	dosis	Tottakhi	IFgn	trf_csp	dcd_csp	dcd	trf	Estimate
Tottakhi	0.622	0.544	0	0	0	0	0	0	0.683
IFgn	0.69	0.375	0.647	0	0	0	0	0	0.749
trf_csp	0.248	0.135	0.233	0.359	0	0	0	0	0.129
dcd_csp	0.02	0.011	-0.018	-0.028	0	0	0	0	0.001
dcd	0.038	0.021	0.035	0.055	0	0.077	0	0	0.009
trf	0.182	0.099	0.17	0.264	0.962	0	0	0	0.875
dcd_he	0.06	0.033	0.056	0.087	0	0.123	1.589	0	2.524
trf_apl	0.175	0.095	0.164	0.254	0.926	0	0	0.963	0.927
trf_he	0.17	0.093	0.16	0.247	0.902	0	0	0.937	0.879
Jnn	-0.53	-0.11	-0.159	-0.565	-0.691	0.001	0.014	0.718	0.861
dcd_apl	0.016	0.009	0.015	0.023	0	0.033	0.426	0	0.182

Standardized Direct Effects - Estimates								
	han	dosis	Tottakhi	IFgn	trf_csp	dcd_csp	dcd	trf
Tottakhi	0.622	0.544	0	0	0	0	0	0
IFgn	0.288	0.023	0.647	0	0	0	0	0
trf_csp	0	0	0	0.359	0	0	0	0
dcd_csp	0	0	0	-0.028	0	0	0	0
dcd	0	0	0	0.057	0	0.077	0	0
trf	0	0	0	-0.082	0.962	0	0	0
dcd_he	0	0	0	0	0	0	1.589	0
trf_apl	0	0	0	0	0	0	0	0.963
trf_he	0	0	0	0	0	0	0	0.937
Jnn	-0.27	-0.01	0.206	-0.377	0	0	0.014	0.718
dcd_apl	0	0	0	0	0	0	0.426	0

Standardized Indirect Effects - Estimates								
	han	dosis	Tottakhi	IFgn	trf_csp	dcd_csp	dcd	trf
Tottakhi	0	0	0	0	0	0	0	0
IFgn	0.402	0.352	0	0	0	0	0	0
trf_csp	0.248	0.135	0.233	0	0	0	0	0
dcd_csp	-0.02	-0.011	-0.018	0	0	0	0	0
dcd	0.038	0.021	0.035	-0.002	0	0	0	0
trf	0.182	0.099	0.17	0.346	0	0	0	0
dcd_he	0.06	0.033	0.056	0.087	0	0.123	0	0
trf_apl	0.175	0.095	0.164	0.254	0.926	0	0	0
trf_he	0.17	0.093	0.16	0.247	0.902	0	0	0
Jnn	0.26	-0.1	-0.366	-0.188	-0.691	0.001	0	0
dcd_apl	0.016	0.009	0.015	0.023	0	0.033	0	0



SURAT KETERANGAN

No 79 /PSBT/II/2005

Bersama ini kami menerangkan bahwa:

Nama : dr. Teguh Wahyu Sardjono, DTM&H, MSc
NIP : 130 809 100
Instansi : Laboratorium Parasitologi Fak. Kedokteran
Universitas Brawijaya, Malang

dalam rangka menyelesaikan program S-3 nya, yang bersangkutan telah melakukan penelitian dengan judul:

Pengaruh Toxoplasmosis terhadap hasil kehamilan melalui peningkatan kadar IFNg, ekspresi caspase 3 dan apoptosis sel-sel plasenta; Studi eksperimental laboratoris pada mencit BALB/c yang diinokulasi dengan T.gondii galur RH.

di Laboratorium Pusat Studi Bioteknologi UGM dari 2 Nopember 2002 sampai dengan 24 Oktober 2003.

Yang bersangkutan telah bekerja di laboratorium dan mematuhi tata tertib standar Kelas P2.

Demikian keterangan dari kami untuk dapat digunakan sebagaimana mestinya.

Yogyakarta, 17 Januari 2005

Kepala,
Uj. Sekretaris PS.Bioteknologi UGM



Dr. Rarasloeti Pratwi
NIP. 131860990

RIWAYAT HIDUP

1. Data Pribadi :

Nama : Teguh Wahyu Sardjono, dr, DTM&H., MSc., SpParK.
N I P : 130 809 100
Tempat/ tanggal lahir : Tuban, 10 April 1952
Agama : Islam
Pangkat / Golongan : Pembina Utama – IV/b
Alamat Rumah : Jl. Simpang Kepuh No 4 A Malang .
 telp. 0341-801329
Alamat Kantor : 1. Laboratorium Parasitologi FK Unibraw
 Jl. Veteran, Malang, telp 0341- 564755 .
 2. Instalasi Laboratonum Sentral RS dr Saiful Anwar
 Jl Jaksa Agung Suprpto No. 2
 Telp. 0341 – 362101 pes 133 MALANG
Nama isteri : Lilik Yusetyani, Dra., Apt.
Anak : 1. Nurrahma Wahyu Fitriyani
 2 .Nuri Rahma Wahyuniasri
 3. Aldilla Wahyu Rahmadian
 4. Rizqi Wahyu Rahmaniadi
 5. Rizal Wahyu Nurahmadi

2. Pendidikan :

Jenis dan Tempat pendidikan	Tahun	Getar
SD Tegallodji I - Banyuwangi	1964	----
SMP Negeri Banyuwangi	1967	----
SMA Negeri Banyuwangi	1970	---
Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga Surabaya	1979	Dokter
Faculty of Tropical Medicine Mahidol University Bangkok	1981	DTM&H
Pradik PPDS Lab/UPF IPD FKUB/RSSA Malang	1989	---
Faculty of Tropical Medicine Mahidol University / The Bangkok Hospital for Tropical Diseases, Bangkok, Thailand.	1991	MSc
Dokter Spesialis Parasitologi Klinik (Pengukuhan).	2004	SpParK

3. Kepangkatan

Jabatan	Pangkat/ Golongan	Terhitung mulai
Calon PNS	Penata Muda Gol III/a	1 Februari 1980
Asisten Ahli Madya	Penata Muda Gol III/a	1 April 1981
Asisten Ahli	Penata Muda Tk I Gol III/b	1 April 1983
Lektor Muda	Penata Gol III/c	1 April 1985
Lektor Madya	Penata Tk I Gol III/d	1 April 1987
Lektor	Pembina Gol IV/a	1 April 1994
Lektor Kepala Madya	Pembina Tk I Gol IV/b	1 Oktober 1998

4. Riwayat Pekerjaan/Jabatan/Organisasi

No	Tahun	Pekerjaan/Jabatan
1.	1960 – sekarang	Staf pengajar Laboratorium Parasitologi FK Unibraw
2.	1980 – sekarang	Anggota IDI Cabang Malang
3.	1988 – 1989	Residen Pradik PPDS1 / SMF Ilmu Penyakit Dalam RSSA/FKUB
4.	1990 – 1991	Mahasiswa Program S-2 (MSc. in Clinical Tropical Medicine) Faculty of Tropical Medicine Mahidol University Bangkok – Thailand
5.	1992 – sekarang	Staf Medik Fungsional/SMF Spes Parazitologi Instalasi Laboratorium Sentral Rumah Sakit dr Saiful Anwar Malang
6.	1991 – 1993 dan 1993 - 1996	Sekretaris Perkumpulan Pemberantasan Penyakit Parasitik Indonesia (P4I) Cabang Malang
7.	1994 – sekarang	Anggota Kelompok Studi Rickettsiosis FK Unibraw
8.	1995 – 2000 dan 2000 - sekarang	Sekretaris Pemimpunan Peneliti Penyakit Tropik dan Infeksi (PETRI) Cabang Malang
9.	1997 – 2000	Ketua Perkumpulan Pemberantasan Penyakit Parasitik Indonesia (P4I) Cabang Malang
10.	1997 – sekarang	Mengajar Ilmu Kedokteran Dasar (Parasitologi) PPDS Bedah FKUB
11.	2001 – sekarang	Dosen Ilmu Parasitologi Program Pendidikan Dokter UMM Malang
12.	2003 – sekarang	Dosen Ilmu Parasitologi Program Pendidikan Dokter Umum - Klaten

5. Karya ilmiah yang dipublikasikan di majalah tingkat nasional (Penulis Utama)

1. Pemeriksaan Pendahuluan Toxoplasmosis dengan metode IHA pada ibu-ibu hamil di RSUD dr Saiful Anwar Malang, *Majalah Kedokteran Tropis Indonesia*, 1988, 1:1
2. Hasil Pemeriksaan Serologis beberapa jenis Penyakit Infeksi di Laboratorium Sentral RSUD dr. Saiful Anwar Malang tahun 1995, *Majalah Kedokteran Unibraw XII* (3). Desember 1996, 1-5.
3. Annelida Polychaeta dalam Saluran Kemih, Infestasi atau Kontaminasi ? *Majalah Kedokteran Indonesia*, 47(12), Desember 1997, 628-632
4. Faktor-faktor yang berpengaruh terhadap keberhasilan penanggulangan penyakit skabies di Pondok Pesantren, *Majalah.Parasitologi.Indonesia*. 11(1), Januari 1998
5. Zat anti Toxoplasma pada ibu yang melahirkan bayi cacat di beberapa Rumah Sakit di Kodya Malang, *Maj. Kedokt. Indon*, vol. 48 No.11, Nopember 1998: 431-5
6. Perbedaan jumlah eosinofil darah tepi pada penderita infeksi cacing usus dan malaria. *Majalah Kedokteran Indonesia*, vol. 49 No. 2, Pebruari 1999:43-8
7. Keberadaan *Toxoplasma gondii* di jaringan plasenta dideteksi dengan teknik PCR dan hubungannya dengan cacat bawaan, *Maj Kedokt.Tropis Indon*. Vol.11 No.1, Mei 2000: 6-16.

6. Karya ilmiah yang dipublikasikan di majalah internasional: (Penulis Pembantu):

1. Detection of Rickettsia typhi DNA in fleas from Peridomestic Rodents Using Polymerase Chain Reaction. 2nd. Asia Pacific Conference on Medical Genetics and Eijkmann Symposium on Molecular Biology of Disease, 19-23 Sept. 1995. p 130 Abst# p11. XII
2. Seroepidemiological evidence for Murine and Scrub Typhus in Malang, Indonesia, *American Journal for Tropical Medicine and Hygiene*, 57 (1), 1997, pp 91-95.

7. Karya ilmiah yang disampaikan pada Seminar tingkat Nasional (Penulis Utama):

1. Perbandingan Hasil Pengobatan Infeksi Cacing Usus dengan tiga macam Obat pada murid-murid SD Lesanpuro, Kecamatan Kedungkandang, Kotamadya Malang, *Pertemuan Ilmiah Regional Parasitologi Kedokteran I, Malang*, 10 Januari 1987
2. Toxoplasmosis pada manusia dan kepentingan diagnosanya. *Pertemuan ilmiah Regional Parasitologi III, Surabaya*, 18 Pebruari 1989.
3. Perubahan jumlah eosinofil darah tepi pada penderita malaria falciparum dengan infeksi berbagai jenis cacing usus, *Pertemuan Ilmiah Regional Parasitologi Kedokteran VI, Surabaya*, Pebruari 1992.
4. Identification of Peridomestic Rats and their Ectoparasites as Potential Vectors for Rickettsial Diseases in Malang, *One Day Seminar on Parasitic Problems in Human and Animals in Indonesia*, Surabaya 20 December 1994.
5. Hasil Pemeriksaan Serologis Beberapa Jenis Penyakit Infeksi di Laboratorium Sentral RSUD Dr. Saiful Anwar Malang, *Presentasi Ilmiah dalam rangka Peresmian PETRI Cabang Malang*, 3 Agustus 1995

6. Zat anti *Toxoplasma* pada ibu-ibu yang melahirkan bayi cacat di beberapa Rumah Sakit di Kota Malang, Pertemuan Ilmiah Tahunan POGI, Makasar, 30 Juni 1997.
7. Keberadaan *Toxoplasma gondii* di jaringan plasenta dideteksi dengan PCR dan hubungannya dengan cacat bawaan. Konas PETRI IV dan Konas PAI VIII Makasar, 18-21 Nopember 1999
8. Hubungan antara Kadar Antibodi *Toxoplasma* pada Serum Ibu Hamil dengan Kejadian Abortus Spontan di RSUD dr Saiful Anwar Malang, Semiloka Parasitologi Nasional, Batu, Malang, 9 - 11 Pebruari 2001
9. Peran Dokter Spesialis Parasitologi Klinik dalam Penatalaksanaan Penyakit Infeksi. Temu Ilmiah dan Kongres Nasional I, PDSParkI, Jakarta 12-13 Juni 2004
10. Peran Laboratorium dalam Diagnosis dan Penatalaksanaan Pendenta Penyakit Tropik Infeksi. Kongres Nasional PETRI VII, Palembang, 5-8 Agustus 2004.

8. Karya ilmiah yang disampaikan pada Seminar Internasional :

1. Changes in peripheral blood eosinophil count during the course of malaria infection, 3rd Western Pacific Congress on Chemotherapy and Infectious Diseases, Nusa Dua, Bali, 7-9 December 1992. (Penulis Utama)
2. Detection of *Rickettsia typhi* DNA in fleas from Peridomestic Rodents Using Polymerase Chain Reaction, 2nd. Asia Pacific Conference on Medical Genetics and Eijkmann Symposium on Molecular Biology of Disease, 19-23 Sept 1995.p 130 Abst# p11.XII. (Penulis Pembantu).
3. The Evidence of Congenital Malformations and its Association with the Prevalence of *Toxoplasma* Infection in Women and Fetuses in Malang, Indonesia, 3rd Asia Pacific Conference on Travel Health and 6th National Congress of Tropical and Infectious Diseases, Kartika Plaza Beach Hotel, Bali, July 21-23, 2000 (Penulis Utama)
4. The Evidence of *Toxoplasmosis* in Spontaneous Abortion Cases in Dr. Saiful Anwar Hospital detected by Serological, Histo-pathological and PCR Analysis. International Parasitic Congress, Bogor, September 2002.

9. Kegiatan kursus yang pernah diikuti:

1. Kursus Metodologi Penelitian dan Penulisan Hasil Penelitian, Malang, 7-8 Juli 1992
2. The Treatment of Chloroquine Resistant Malana, Surabaya, 2 Pebruari 1993
3. Simposium & Workshop on Drug Resistance of *Plasmodium falciparum*, Jakarta 29-30 Mei 1993
4. 9th Postgraduate Course on Immunology, Surabaya, 14 -17 November 1994.
5. Kursus Immunologi Dasar, Pendidikan Kedokteran Berkelanjutan Ilmu Penyakit Dalam FK Unibraw RS Dr Saiful Anwar Malang, Malang, 27 Januari – 21 April 1995
6. Kursus Pendidikan Singkat (Short Course) Kepemimpinan Eksekutif, Indogement – FIA Unibraw, Malang, 18 – 20 Januari 1996
7. Kursus Teknik-teknik Dasar Analisa Protein dan DNA, Malang, 2 – 13 September 1996

- 8 Kursus Penyegaran Penerapan Teknik Polymerase Chain Reaction (PCR) untuk Diagnosis Penyakit Infeksi, Bandung, 23 - 25 Juli 1997
- 9 Kursus Evidence Based Medicine, Malang 28 - 29 Juni 2002
- 10 The 2nd Asia-Pacific Basic Course on Travel Medicine, Jakarta, June 15 - 16, 2002

10. Karya ilmiah dalam bentuk buku

- 1 Diktat Parasitologi untuk Program Diploma III Kesehatan, 1990 (Penulis utama & editor)
- 2 Modul 5 - 6 Kursus Ilmu Kedokteran Dasar, PPDS I FK Unibraw Program Studi Ilmu Bedah : Penyakit-penyakit parasit yang mengenai sistem muskuloskeletal dan sistem syaraf (1997, 1998-sekarang - Penulis utama)
- 3 Buku Ajar Malana. Mekanisme Terjadinya Penyakit dan Pedoman Penanganannya, 2000 (Penulis utama)
- 4 Buku Ajar Parasitologi untuk Mahasiswa Kedokteran (kontributor)
 - a Nematoda
 - b Platyhelminthes
 - c Arthropoda
 - d Protozoa
- 5 Pemeliharaan Kesehatan selama Perjalanan Haji : Buku Bimbingan Manasik dan Kesehatan Haji, Rumah Sakit Islam Aisyiyah Malang tahun 1997. ISBN No 979 - 9802 - 04 - 7 (kontributor)
- 6 Penyakit zoonotik-parasitik yang ditularkan melalui makanan (dalam penulisan).

11. Penelitian-penelitian yang tidak/belum dipublikasikan:

- 1 **Sardjono TW, Purwandari MF, Basuki S, Yulia AR.** 2001. Perubahan derajat apoptosis sel-sel trofoblas mencit (BALB/c) selama proses kebuntingan normal
- 2 **Sardjono TW, Yusuf KM, Yulia AR, Basuki S** 2001. Perubahan derajat apoptosis sel-sel desidua pada mencit (BALB/c) selama proses kebuntingan normal
- 3 **Sardjono TW, Muhamad L, Fatchiyah.** 2001. Analisis pola fragmentasi DNA dan deteksi DNA *Toxoplasma gondii* dari jaringan sisa abortus spontan
- 4 **Sardjono TW, Zaimi Z, Widjajanto E, Wahyuni ES.** 2002 Kajian tentang perubahan profil leukosit darah tepi dan uterus mencit (BALB/c) pada kebuntingan normal
- 5 **Sardjono TW (2003).** Optimasi dosis inokulan *Toxoplasma gondii* galur RH pada mencit galur Balb/c dan perubahan patologis yang terjadi pada darah tepi jaringan otak dan hepar. (Studi pendahuluan)
- 6 **Prabawati NG, Mudjiwiyono HE, Ismanoe G, Sardjono TW.** 2003. Efek dosis dan lama infeksi dapatan *Toxoplasma gondii* terhadap peningkatan derajat nekrosis pada hati mencit
- 7 **Dewi AR Widjajanto E, Ismanoe G, Sardjono TW.** 2003 Pengaruh lama infeksi dan dosis inokulan terhadap jumlah dan persentase leukosit darah tepi *Mus musculus* galur BALB/c yang diinfeksi *Toxoplasma gondii* galur RH.
- 8 **Indrati RR Sarwono I, Sardjono TW.** 2003 Pengaruh peningkatan dosis infeksi *Toxoplasma gondii* galur RH terhadap perubahan patologis pada otak *Mus musculus* galur BALB/c

...

- 9 **Sardjono TW**, Romdioni AA, Sudjari Baskoro AD, Widayat M, Soebaktiningsih, Kamanda C, Fitri LE. 2003. Malaria Impor dan Studi Kasus Resistensi *Plasmodium falciparum* terhadap Sulfadoksin-Pirimetamin pada Anggota TNI-AD Pasca Tugas dari Ambon
- 10 **Sardjono TW**, Damayanti VE, Permatasan N, Soebaktiningsih, Sudjari, Baskoro AD, Widayat M, Kamanda C, Fitri LE. 2003. Studi Kasus dan Uji Resistensi *Plasmodium falciparum* terhadap Klorokuin pada Anggota TNI-AD di Malang pasca Tugas dari Luar Jawa
- 11 Fitri LE, Arnawa IKG, **Sardjono TW**. 2003. Uji Resistensi *Plasmodium falciparum* terhadap Klorokuin secara in vitro pada beberapa isolat Penderita yang Dirawat di RS Saiful Anwar Malang
- 12 Fitri LE, Nugraheni T, Sudjari, **Sardjono TW**. 2003. Uji Kepekaan Kuinin terhadap *Plasmodium falciparum* pada Isolat yang Ditemukan di Malang.
- 13 Masfufah D, Fitri LE, Basuki A, Iskandar A, Riawan W, **Sardjono TW**. 2004. Efek Pemberian Kombinasi Klorokuin dan *N-acetyl cystein* terhadap Perubahan Sel Apoptosis pada Jaringan Otak Mencit Galur BALB/c yang Diinfeksi *Plasmodium berghei*
- 14 Fitri LE, Handayani V, Kusworini, Sudjari **Sardjono TW**. 2004. Hubungan antara Intensitas Antigen HRP II dan Antigen Pan dengan Derajat Parasitemia pada Kasus Malaria Akut yang Diterapi dengan Klorokuin di Malang .
- 15 Rahimah AF, Supranowo, Ismanoe G, **Sardjono TW** 2004 Pengaruh peningkatan dosis dan lama infeksi *Toxoplasma gondii* galur RH terhadap perubahan patologis jaringan paru *Mus musculus* galur BALB/c.
16. Haq W, **Sardjono TW**, Norahmawati E, Fitri LE. 2005. Efek Pemberian Kombinasi Klorokuin dan *N-acetyl cystein* terhadap Perubahan Sel Apoptosis pada Hepar Mencit Galur BALB/c yang Diinfeksi *Plasmodium berghei*.