

DISERTASI

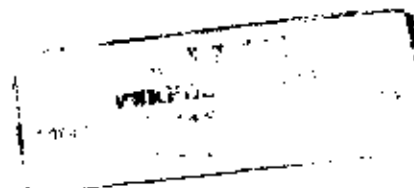
MEKANISME PENINGKATAN APOPTOSIS TROFOBLAS MENCIT BUNTING TERINFEKSI *TOXOPLASMA GONDII* MELALUI PENINGKATAN SEL DESIDUA PENGHASIL IFN- γ DAN TNF- α SERTA TROFOBLAS PENGHASIL FAS DAN TNFR-1

*Disertasi
Suwanti*



LUCIA TRI SUWANTI

**PROGRAM PASCASARJANA
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2005**



**MEKANISME PENINGKATAN APOPTOSIS TROFOBLAS
MENCABUT BUNTING TERINFEKSI TOXOPLASMA GONDII MELALUI
PENINGKATAN SEL DESIDUA PENGHASIL IFN- γ DAN TNF- α
SERTA TROFOBLAS PENGHASIL FAS DAN TNFR-1**

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 : Kamis
Tanggal : 15 September 2005
Pukul 10.00 WIB

Oleh

LUCIA TRI SUWANTI MP, dr.
NIM. 090113047 D

LEMBAR PENGESAHAN DISERTASI

**DISERTASI INI TELAH DISETUJUI
TANGGAL 22 Agustus 2005**

Oleh

Promotor



Prof. Dr. H. Rochiman Sasmita, drh, MS
NIP. 130350739

Ko promotor I



Prof. Dr. Suhartono Taat Putra, dr, MS
NIP. 130934628

HALAMAN PENETAPAN PANITIA PENGUJI DISERTASI

Telah diuji pada

Tanggal 19 Agustus 2005

PANITIA PRNGUJI DISERTASI

Ketua : Prof H Soedarto, dr, SpParK, DTM&H, PhD

Anggota : 1. Prof. Dr. H. Rochiman Sasmita, drh, MS

2. Prof Dr. Suhartono Taat Putra, dr, MS.

3. Prof Kuntoro, dr, MPH, DrPH

4. Dr Sri Hidayati Bayu Santoso, dr, MS

5. Dr Fedik Abdul Rantam, drh

6. Dr Umi Cahyaningsih, drh, MS

7. Dr Ketut Suidiana, drs, MS



Surat Keputusan Rektor Universitas Airlangga

No: 6175/J03/PT/2005

Tanggal: 24 Agustus 2005

UCAPAN TERIMA KASIH

Tiada ungkapan kata dan tulisan yang dapat mewakili rasa syukur saya kepada Dia, Sang Sumber Hidup, atas segala kurnia dan rahmat yang dilimpahkan kepada saya hingga penelitian dan penulisan disertasi ini selesai.

Ungkapan terima kasih, yang saya rasa tidak akan memadai hanya dengan lembar tulisan ucapan ini, saya sampaikan kepada:

Prof.Dr H Rochiman Sasnita, drh, MS, selaku pembimbing akademik dan promotor, yang telah banyak memberikan dorongan, arahan dan bimbingan mulai sejak awal perkuliahan sampai disertasi ini selesai. Di saat semangat ini mulai mengendor karena berbagai kendala, beliau selalu murah dengan tutur kata yang membesarkan hati. Bahkan sejak sebelum saya mengikuti program doktor, selaku pimpinan Laboratorium Entomologi dan Protozoologi, beliau selalu mendorong kami, para stafnya, untuk selalu mengembangkan diri, termasuk dengan mengikuti Program Doktor.

Prof.Dr Suhartono Taat Putra, dr, MS, yang telah bersedia menjadi ko-promotor saya. Selaku ko-promotor dan dosen pengasuh matakuliah Patobiologi, beliau dengan berbagai pertanyaan yang cerdas dan banal telah membuka wawasan saya sehingga saya tersadarkan bahwa ada masalah yang dapat diangkat sebagai disertasi. Dari beliau saya banyak belajar tentang sikap optimistik dan ketabahan selagi berhadapan dengan masalah

Pemerintah Negara Kesatuan Republik Indonesia, melalui Menteri Pendidikan Nasional dan Direktorat Jendral Pendidikan Tinggi yang telah memberikan kesempatan untuk mengikuti pendidikan Program Doktor dengan biaya BPPS.

Rektor Universitas Airlangga Surabaya, Prof Dr Med H Puruhito, dr SpB.TKV beserta staf, juga mantan rektor Universitas Airlangga Surabaya, Prof H Soedarto, dr, SpParK, DTM&H, PhD beserta staf, yang telah memberikan kesempatan dan fasilitas kepada diri saya sebagai peserta Program Doktor Pascasarjana Universitas Airlangga

Direktur Program Pascasarjana Universitas Airlangga, Prof Dr Mohammad Amin, dr SpP(K) beserta staf, atas kesempatan dan fasilitas yang telah diberikan kepada saya untuk mengikuti pendidikan di Pascasarjana Universitas Airlangga.

Ketua Program Studi Ilmu Kedokteran Program Pascasarjana Universitas Airlangga, Prof Dr Mandojo Rukino, drg, MS, SpKG dan mantan Ketua Program Studi Ilmu Kedokteran Program Pascasarjana Universitas Airlangga, Prof Dr Hj Juliati Hood AlsegafE, dr, MS, SpPA, FLAC, atas arahan, perhatian dan kemudahan yang saya terima sehingga memperlancar proses studi saya.

Dekan Fakultas kedokteran Hewan Universitas Airlangga Surabaya, Prof Dr Ismudiono, drh, MS, beserta para staf yang telah memberikan ijin dan kesempatan untuk mengikuti pendidikan Program Doktor

Para dosen di Program Studi Ilmu Kedokteran Program Pascasarjana Universitas Airlangga, terutama Prof H Bambang Rahino Setokusumo, dr, Prof Eddy Pronowo Soediby, dr, MPH (Alm); Prof Dr Koento Wibisono Siswomihardjo; Prof Dr Muhammad Zainuddin, Apt; Widodo J Pudjiraharjo, dr, MS, MPH, DrPH; Fuad Amsyari, dr, MPH, PhD; Prof Dr Suhartono Taat Putra, dr, MS; Prof Dr J Glinka SVD; Siti Pariani, dr, MS, MSc, PhD; Dr I. Dyson, MA; Prof Kuntoro, dr, MPH, DrPH, Prof Purnomo Suryohudoyo, dr, SpBK; Prof Dr PG.Konthen, dr, SpPD; Dr Ketut Sudiana, drs, MS; Prof Soetjipto, dr, MS, PhD; Prof H Soedarto, dr, SpParK.

DTM&H, PhD dan Dr Fedik Abdul Rantam, drh, mereka telah menambah wawasan saya dalam ilmu seturut bidang kepakaran mereka.

Para penguji pada ujian Kualifikasi, Proposal, Seminar Kelayakan dan Tertutup, yakni Prof Dr H Rochiman Sasmita, drh, MS; Prof H Soedarto, dr, SpParK, DTM&H, PhD; Prof. Dr Suhartono Taat Putra, dr, MS, Dr Ketut Sudiana, drs, MS; Dr Fedik Abdul Rantam, drh; Prof Dr Hj Sri Subekti Bendriman, drh, DEA, Dr Umu Cahyaningsih, drh, MS, Prof Sarmanu, MS, drh; Prof Kuntoro, dr, MPH, DrPH; Prof Dr Soehartojo Hardjopranjoto, drh; MSc dan Dr Sri Hidayati Baju Santoso, dr, MS atas masukan pemikiran dan penyempurnaan alur ilmiah kerangka penelitian dan disertasi ini

Kepala Bagian Parasitologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga, Prof Dr H Rochiman Sasmita, drh, MS; dan mantan Kepala Laboratorium Entomologi dan Protozoologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga, Endang Suprihati, drh, MS, yang telah memberikan dorongan dan semangat kepada saya untuk mengikuti Program Doktor

Semua teman sejawat di Bagian Parasitologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga Surabaya, Nunuk Dyah Retno Lastuti, drh MS; Endang Suprihati, drh, MS; Kismiyati, Ir, MSi; Gunanti Maharsi, Ir, MSi; Poedji Hastutick, drh, MSi; Mufasirin, drh, MSi; Muhammad Yunus, drh MS, PhD.; Agus Sunarso, drh; Ririn Ngesti Wahyuti, drh, MKes; Prof. Dr Hj Sri Subekti Bendriman, drh, DEA; Prof Dr H Setiawan Kusdarto, drh, MSc; Sri Mumpuni, drh, MKes; Halimah Puspitawati, drh, MKes dan Kusnoto, drh, MS, atas pengertian, kerjasama, dorongan semangat dan bantuan moril yang diberikan kepada saya sehingga penelitian ini bisa selesai

Kepala Bagian Patologi Fakultas Kedokteran Hewan, Ajik Azmijah, drh, SU beserta para sejawat di Bagian Patologi, Roesno Darsono, drh; Arimbi, drh, MKes,

Thomas V Widiyatno, MKes, drh dan Hani Plumeriastuti, drh, MKes yang rela memberikan tempat dan mengizinkan saya menggunakan fasilitas untuk mengerjakan penelitian di Laboratorium Patologi.

Ketua Pusat Studi Bioteknologi dan Dr Wayan Tunas Artama, drh, yang telah memberikan kesempatan saya untuk melakukan kerja laboratorik dan menggunakan fasilitas Laboratorium serta memberikan isolat *Toxoplasma* secara gratis sehingga penelitian ini terlaksana.

Teman-teman peserta Program Doktor Pasca Sarjana Universitas Airlangga Surabaya Angkatan 2001/2002. Kalian selalu mengingatkanku tentang kebersamaan kita selama mengalami suka dan duka selama menjalani pendidikan.

Rekan saya: Hani Plumeriastuti, drh, MKes; Ririn Ngeti Wahyuti, drh, MKes; Yeni Sumariani, drg, MS; Retno Indrawati, drg, MSi; Eha Renwi Astuti, drg, MKes; Susilowati Andayani, dr, MKes; Mustofa Helmi Effendi, drh, MSc; Dr Theresia Indah Budi, drg, MKes; Dr Diah Savitri Ernawati, drg, MSi, yang telah banyak memberikan masukan pemikiran dan dorongan semangat. Terutama sahabat dekatku kepada siapa keluh kesah kucurahkan: Hani Plumeriastuti. Terima kasih atas kerelaanmu menjadi tempat menumpang setiap kali aku menemui kesulitan selama masa pendidikan.

Semua rekan teknisi dari Bagian Parasitologi FKH Unair, Pak Dinir dan Mbak Susilowati; Bagian Patologi FKH Unair Pak Mardjuki, Mas Jumawan dan Mbak Siti Mulyaningsih; Laboratorium Gramik, Mbak Leni serta teknisi dari Pusat Studi Bioteknologi UGM Mas Tukijo dan Mbak Tri, yang telah banyak membantu saya selama saya melakukan penelitian.

Yayasan Bhumiksara dan APTIK yang memberi beasiswa Misereor Nasional melalui Rektor Universitas Widya Mandala, Prof Dr JS Ami Soewandi dan Pembantu

Rektor I Universitas Widya Mandala, Drs Kuncoro Foe PhD, selaku Penanggung Jawab beasiswa Misereor Nasional di Surabaya.

Mas Irbar sekeluarga beserta semua rekan Lenongan Bogor Semesta, Adik Yohan sekeuarga, Adik Dipo, Bang Udin, Arfan, Sugeng dan Mukti yang telah banyak memberikan dukungan moril-spiritual-eternal sehingga saya melampaui berbagai kesulitan selama pendidikan doktor.

Kedua orang tua saya Bapak L Sandiwan Broto dan Ibu MM Sadiyem Sandiwan Broto, yang dengan penuh kesabaran telah membesarkan, mendidik, membimbing dan selalu menyertaiku dengan doa sehingga aku menjadi manusia mandiri dan tahu akan terima kasih. T tutur dan tindak Bapak dan Ibu menjadi keteladanan yang mengilhamiku untuk mendidik kedua anakku dan para mahasiswaku.

Mertua saya, Bapak AY Suyadi dan Ibu Yuliana Sumini (Alm), atas segala doa untuk kami sekeuarga. Terima kasih atas kasih sayang yang kami rasakan.

Kedua anakku, Vincentia Dety Abrita dan Leonardus Dewa Hardana, yang telah banyak berkorban demi keberhasilan studi mama. Bagi mama kalian berdua adalah anak yang hebat. Mama bangga terhadap kalian dan mama merasa kesepian tanpa kalian.

Suamiku tercinta, Edy Suhardono. Kaulah temanku, pembangkit semangatku lewat sindiran, guyonan, penghiburan, dan berbagai kejutan pemikiranmu yang membuatku berani menjelajah daerah pengetahuan yang baru bagiku.

Semua pihak yang telah membantu saya selama saya menempuh program doktor, yang tidak mungkin saya sebut satu persatu

RINGKASAN

Mekanisme Peningkatan Apoptosis Trofoblas Mencit Bunting Terinfeksi *Toxoplasma gondii* Melalui Peningkatan Sel Desidua penghasil IFN- γ dan TNF- α serta Trofoblas Penghasil Fas dan TNFR-1

Lucia Tri Suwanti

Mekanisme apoptosis trofoblas mencit bunting yang terinfeksi *Toxoplasma gondii* belum diketahui dengan jelas. Diperkirakan mekanisme melalui peningkatan sel penghasil IFN- γ dan TNF- α di desidua serta Fas dan TNFR-1 di trofoblas

Empat puluh delapan mencit Swiss bunting dibagi menjadi 6 kelompok perlakuan. Kelompok I mencit umur kebuntingan minggu pertama tidak diinfeksi dan kelompok II umur kebuntingan minggu pertama diinfeksi., Kelompok III mencit umur kebuntingan minggu kedua tidak diinfeksi dan kelompok IV umur kebuntingan minggu kedua diinfeksi. Kelompok V mencit umur kebuntingan minggu ketiga tidak diinfeksi dan kelompok VI umur kebuntingan minggu ketiga diinfeksi. Infeksi dilakukan secara intraperitoneal dengan dosis 1×10^3 takizoit tiap mencit. Empat hari setelah infeksi mencit dikorbankan, diambil plasenta untuk dilakukan pengamatan terhadap indeks apoptosis trofoblas, ekspresi IFN- γ dan TNF- α di desidua serta ekspresi Fas dan TNFR-1 di trofoblas. Penentuan indeks apoptosis trofoblas dengan TUNELL ASSAY menggunakan *Apoptotic kit Apop tag*, sedangkan ekspresi IFN- γ , TNF- α , Fas dan TNFR-1 dengan pewarnaan imunohistokimia. Pengamatan dilakukan di bawah mikroskop dengan perbesaran 400 kali dan dari setiap slide ditentukan 6 lapang pandang secara acak sebagai daerah pengamatan. Data dianalisis dengan MANOVA dan Analisis Diskriminan.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa terdapat perbedaan respons inflamasi plasenta antara mencit yang diinfeksi dan yang tidak diinfeksi (Wilks' Lamda 0,060 dan $p < 0,05$). Respons inflamasi plasenta ditentukan berdasarkan pengamatan indeks apoptosis trofoblas, persentase jumlah limfosit desidua penghasil IFN- γ , persentase makrofag desidua penghasil TNF- α , persentase jumlah sel trofoblas yang mengekspresikan Fas dan TNFR-1. Setiap variabel pengamatan berperan terhadap perbedaan respons inflamasi plasenta. Terjadi peningkatan indeks apoptosis, ekspresi IFN- γ , TNF- α , Fas dan TNFR-1 yang tajam pada kelompok mencit yang diinfeksi. Dengan Uji LSD terdapat perbedaan pada setiap kelompok perlakuan.

Indeks apoptosis trofoblas pada mencit yang diinfeksi *T.gondii* apabila dibandingkan dengan kelompok yang tidak diinfeksi menunjukkan perbedaan yang nyata. Pada mencit kelompok umur kebuntingan minggu pertama Indeks apoptosis trofoblas meningkat dari 9,33% menjadi 40,19% (4,3 kali), pada minggu kedua dari 10,19% menjadi 49,11% (4,8 kali) dan pada minggu ketiga dari 32,46% menjadi 50,08% (1,5 kali). Dengan uji LSD terdapat perbedaan pada tiap kelompok perlakuan. Baik pada kelompok mencit yang diinfeksi maupun yang tidak diinfeksi terlihat peningkatan indeks apoptosis sejalan dengan umur kebuntingan dan perbedaan tersebut sangat nyata ($P < 0,01$) kecuali pada kelompok mencit tidak diinfeksi umur kebuntingan minggu pertama dan kedua secara statistik tidak berbeda nyata ($p > 0,05$)

Jumlah limfosit desidua yang menghasilkan IFN- γ pada kelompok mencit yang terinfeksi terlihat terjadi peningkatan dibanding dengan kelompok tidak diinfeksi. Pada

umur kebuntingan minggu pertama meningkat dari 32,05% menjadi 48,18% (1,5 kali), pada minggu kedua dari 27,67% menjadi 39,32% (1,4 kali) dan pada minggu ketiga dari 16,74% menjadi 48,31% (2,9 kali). Dengan Uji LSD, jumlah limfosit desidua yang menghasilkan IFN- γ pada kelompok mencit tidak diinfeksi menurun sejalan dengan umur kebuntingan, sedangkan pada kelompok terinfeksi umur kebuntingan pertama tinggi kemudian menurun pada minggu kedua dan meningkat pada minggu ketiga. dan jumlah limfosit desidua yang menghasilkan IFN- γ pada minggu pertama tidak berbeda nyata dengan minggu ketiga

Persentase jumlah makrofag yang menghasilkan TNF- α : pada mencit yang diinfeksi *T. gondii* pada umur kebuntingan minggu pertama meningkat dari 23,99% menjadi 35,59% (1,5 kali), pada minggu kedua dari 14,12% menjadi 30,47% (2,2 kali) dan pada minggu ketiga dari 10,64% menjadi 30,18% (2,8 kali). Pada mencit yang tidak diinfeksi dan diinfeksi ekspresi TNF- α : tertinggi pada kebuntingan minggu pertama dan mulai menurun pada umur kebuntingan minggu kedua dan ketiga. Persentase jumlah makrofag yang menghasilkan TNF- α : pada minggu pertama berbeda nyata dengan persentase TNF- α : pada umur kebuntingan minggu kedua dan ketiga, tetapi ekspresi TNF- α : pada kelompok umur kebuntingan minggu kedua dan ketiga tidak berbeda

Persentase jumlah trofoblas yang mengekspresikan Fas meningkat tajam pada kelompok mencit yang diinfeksi *T. gondii* apabila dibandingkan dengan kelompok tidak terinfeksi, kelompok umur kebuntingan minggu pertama meningkat dari 3,65% menjadi 27,11% (7,4 kali), pada minggu kedua dari 5,37% menjadi 38,50% (7,2 kali) dan pada minggu ketiga dari 11,64% menjadi 41,44% (3,6 kali). Ekspresi Fas: pada kelompok mencit yang tidak diinfeksi pada kelompok umur kebuntingan minggu pertama dan kedua tidak berbeda nyata tetapi kedua kelompok tersebut berbeda nyata dengan kelompok umur kebuntingan minggu ketiga. Pada kelompok mencit terinfeksi, ekspresi Fas pada kelompok umur kebuntingan minggu pertama berbeda nyata dengan kelompok umur kebuntingan minggu kedua dan ketiga, tetapi kelompok umur kebuntingan minggu kedua dan ketiga tidak berbeda nyata.

Persentase jumlah trofoblas yang mengekspresikan TNFR-1 pada mencit yang diinfeksi apabila dibandingkan dengan kelompok mencit yang tidak diinfeksi terlihat ada peningkatan. Peningkatan tersebut adalah: pada kelompok umur kebuntingan minggu pertama meningkat dari 10,40% menjadi 35,01% (3,4 kali), pada minggu kedua dari 13,94% menjadi 35,28% (2,5 kali) dan pada minggu ketiga dari 13,97% menjadi 33,52% (2,4 kali). Umur kebuntingan terlihat tidak berpengaruh pada ekspresi TNFR-1. Ekspresi TNFR-1 pada umur kebuntingan minggu pertama, kedua dan ketiga tidak berbeda nyata

Pola respons inflamasi plasenta pada kelompok umur kebuntingan minggu pertama didominasi oleh variabel indeks apoptosis trofoblas dan ekspresi IFN- γ . Pola respons inflamasi plasenta pada kelompok umur kebuntingan minggu kedua didominasi oleh variabel indeks apoptosis trofoblas Pola respons inflamasi plasenta pada kelompok umur kebuntingan minggu ketiga didominasi oleh variabel ekspresi IFN- γ dan Fas

Mekanisme peningkatan apoptosis trofoblas mencit bunting akibat infeksi *Toxoplasma gondii* melalui peningkatan persentase jumlah limfosit desidua penghasil IFN- γ dan peningkatan jumlah persentase trofoblas yang mengekspresikan Fas.

SUMMARY

The Mechanism of the Increase of Trophoblast Apoptosis in *Toxoplasma gondii*-Infected Pregnant Mice Through The Increase of Decidual Cell Produced IFN- γ and TNF- α , and Trophoblast Cell Produced Fas and TNFR-1

Lucia Tri Suwanti

The mechanism of trophoblast apoptosis in *Toxoplasma gondii*-infected pregnant mice has not been fully understood. It was thought that the mechanism could be explained with the increase of IFN- γ and TNF- α expression in decidua as well as Fas and TNFR-1 expression in trophoblast

Forty-eight pregnant Swiss mice were divided into 6 groups. Group I, first week gestation non-infected mice. Group II, first week gestation infected mice. Group III, second week gestation non-infected mice. Group IV, second week gestation infected mice. Group V, third week gestation non-infected mice. Group VI, third week gestation infected mice. Mice were infected with 1×10^3 doses by intraperitoneal. Four days post infection, mice were sacrificed, placenta was removed for observation trophoblast apoptosis index and IFN- γ , TNF- α , Fas and TNFR-1 expression. TUNEL ASSAY with *Apoptotic kit Apop tag* was used to observe trophoblast apoptosis index and immunohistochemistry was used to observe the IFN- γ , TNF- α , Fas and TNFR-1 expression. The data were analysed by MANOVA and Discriminant Analysis.

The result showed that inflammatory responses of placenta were significantly difference (Wilks' Lamda 0,060 and $p < 0.05$) between infected mice and non-infected mice. The inflammatory response of placenta were determined based on trophoblast apoptosis index and IFN- γ , TNF- α , Fas and TNFR-1 expression. By LSD post hoc test, all groups were significantly different. All variables (trophoblast apoptosis index and IFN- γ , TNF- α , Fas and TNFR-1 expression) were increasing in infected mice.

Trophoblast apoptosis index on first week gestation in infected mice increased 4.3 times (from 9.33% to become 40.19%); second week gestation in infected mice increased 4.8 times (from 10.19% to become 49.11%) and third week gestation infected in mice increased 1.5 times (from 32.46% to become 50.08%). Trophoblast apoptosis index increased through gestation old.

IFN- γ expression in the first week gestation infected mice increased 1.5 times (from 32.05% to become 48.18%); in second week gestation, the increase was 1.4 times (from 27.67% became 39.32%) and in the third week gestation, the increase was 2.9 times (from 16.74% to become 48.31%). In non-infected mice, IFN- γ expression decreased along with gestational age. However, in infected mice, the expression was high at the first week gestation, decreased at the second week, and increased again at the third week gestation.

In infected mice, TNF- α expression, in first week gestation, increased 1.5 times (from 23.99% to become 35.59%); in second week gestation increased 2.2 times (from 14.12% to become 30.47%) and in third week gestation increased 2.8 times (from 10.64% to become 30.18%). In non infected mice, TNF- α expression in first week gestation was highest and significantly different with in the second and third, but

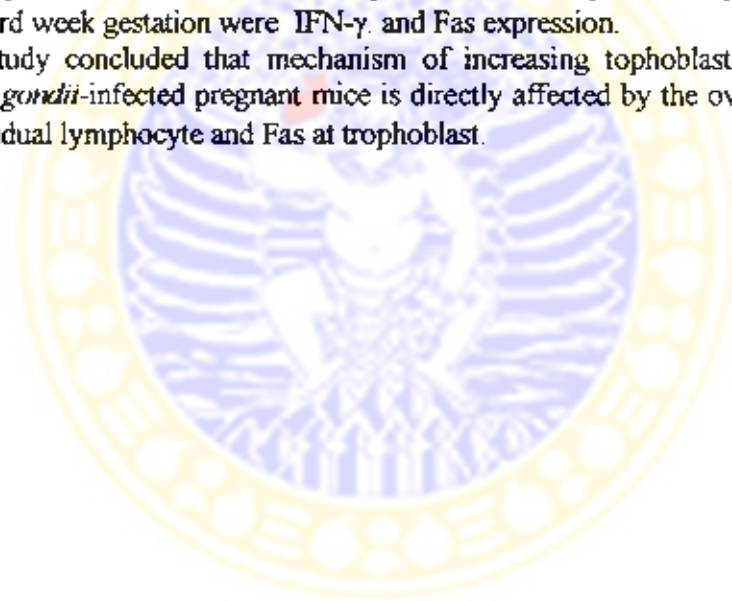
in the second was not significantly different with the third week gestation. Its also were seen in the infected mice.

Fas expression in first week gestation infected mice increased 7.4 times (from 3.65% to become 27.11%); in second week increased 7.2 times (from 5.37% to become 38.50%) and in the third week increased 3.6 times (from 11.64% to become 41.44%). In non-infected mice, Fas expression, in first week gestation was not significantly different with in the second, but in the first and the second were significantly different with in the third week gestation. However, in infected mice, Fas expression in first week gestation was significantly different with in the second and the third, but in the second was not significantly different with in the third week gestation.

TNFR-1 expression in first week gestation infected mice increased 3.4 times (from 10.40% to become 35.01%); second week gestation infected mice increased 2.5 times (from 13.94% to become 35.28%) and third week gestation infected mice increased 2.4 times (from 13.97% to become 33.52%)

There were 3 patterns of inflammatory response of placenta at different gestational age. The predominant variables in the pattern of inflammatory response of placenta in the first week gestation in infected mice were trophoblast apoptosis index and IFN- γ expression, at the second week gestation were trophoblast apoptosis index and at the third week gestation were IFN- γ and Fas expression.

This study concluded that mechanism of increasing tophoblast apoptosis in *Toxoplasma gondii*-infected pregnant mice is directly affected by the over expression IFN- γ at decidual lymphocyte and Fas at trophoblast.



ABSTRACT

**The Mechanism of the Increase of Trophoblast Apoptosis
in *Toxoplasma gondii*-Infected Pregnant Mice Through The Increase of Decidual
Cell Producted IFN- γ and TNF- α and Trophoblast Cell Producted Fas and
TNFR-1**

Lucia Tri Suwanti

The main purpose of this study was to discover the mechanism of increasing trophoblast apoptosis in *Toxoplasma gondii*-infected pregnant mice.

Forty-eight pregnant Swiss mice were divided into 6 groups. Group I, first week gestation non-infected mice. Group II, first week gestation infected mice. Group III, second week gestation non-infected mice. Group IV, second week gestation infected mice. Group V, third week gestation non-infected mice. Group VI, third week gestation infected mice. Mice were infected with 1×10^3 doses by intraperitoneal. Four days post infection, mice were sacrificed, placenta was removed for observation trophoblast apoptosis index and IFN- γ , TNF- α , Fas and TNFR-1 expression. TUNEL ASSAY was used to observe trophoblast apoptosis index and immunohistochemistry was used to observe the IFN- γ , TNF- α , Fas and TNFR-1 expression. The data were analysed by MANOVA and Discriminant Analysis.

The result showed that inflammatory responses of placenta were significantly difference (Wilks' Lamda 0,060 and $p < 0.05$) between infected mice and non-infected mice. The inflammatory response of placenta were determined based on trophoblast apoptosis index and IFN- γ , TNF- α , Fas and TNFR-1 expression. By LSD post hoc test, all groups were significantly different. All variables (trophoblast apoptosis index and IFN- γ , TNF- α , Fas and TNFR-1 expression) were increasing in infected mice.

There were 3 patterns of inflammatory response of placenta at different gestational age. The predominant variables in the pattern of inflammatory response of placenta in the first week gestation in infected mice were trophoblast apoptosis index and IFN- γ expression, at the second week gestation were trophoblast apoptosis index and at the third week gestation were IFN- γ and Fas expression.

This study concluded that mechanism of increasing tophoblast apoptosis in *Toxoplasma gondii*-infected pregnant mice is directly affected by the over expression IFN- γ at decidual lymphocyte and Fas at trophoblast.

Keywords: *Toxoplasma gondii*, trophoblast apoptosis, IFN- γ , TNF- α , Fas, TNFR-1

DAFTAR ISI

	Halaman
SAMPUL LUAR	i
SAMPUL DALAM	ii
PRASYARAT GELAR DOKTOR	iii
PERSETUJUAN	iv
PENETAPAN PANITIA UJIAN	v
UCAPAN TERIMA KASIH	vi
RINGKASAN	xii
SUMMARY	xiv
ABSTRACT	xvi
DAFTAR ISI	xvii
DAFTAR GAMBAR	xx
DAFTAR TABEL	xxi
DAFTAR LAMPIRAN	xxii
DAFTAR SINGKATAN	xxiii
BAB 1 PENDAHULUAN	1
1.1. Latar Belakang Masalah	1
1.2. Rumusan Masalah	8
1.3. Tujuan	8
1.4. Manfaat	9
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA	10
2.1. Infeksi <i>Toxoplasma gondii</i>	10
2.1.1. <i>Toxoplasma gondii</i>	10
2.1.2. Morfologi dan Siklus Hidup <i>T. gondii</i>	11
2.1.3. Sumber Infeksi dan Cara Penularan	14
2.1.3. Galur dan Virulensi	16
2.1.5. Respons Imun terhadap Infeksi <i>T. gondii</i>	17
2.1.6. Infeksi <i>T. gondii</i> pada Saat Kebuntingan	22
2.1.7. Infeksi <i>T. gondii</i> dan Perubahan Patologis Plasenta	27
2.1.8. Diagnosa Toxoplasmosis	28
2.1.9. Pencegahan Toxoplasmosis	30
2.1.10 Pengobatan Toxoplasmosis	31
2.2. Sitokin	32
2.2.1 Interferon Gama (IFN- γ) dan Tumor Necrosis Factor Alfa (TNF- α).....	34
2.3 Apoptosis	36
2.3.1. Apoptosis Melalui Jalur Reseptor Kematian	37
2.3.1.1. Apoptosis Melalui Jalur Fas- Fas Ligan (CD95/CD95L).....	38
2.3.1.2. Apoptosis Melalui Jalur TNF-TNFR	40
2.4. Desidua dan Trofoblas	42
2.5 Respon Imun terhadap Kebuntingan	44
2.6 Pengaruh Hormon Kebuntingan pada Sistem Imun	49
2.7 Apoptosis Trofoblas, Sitokin di Plasenta dan Kegagalan Kebuntingan	50
2.8. Apoptosis pada Infeksi <i>T. gondii</i>	54
2.9. Mencit Sebagai Hewan Coba	56

2.10 Kebuntingan pada mencit	57
BAB 3 KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS	59
3.1. Kerangka konseptual	59
3.2. Hipotesis	63
BAB 4 METODE PENELITIAN	64
4.1. Rancangan Penelitian	64
4.2. Sampel, Besar Sampel dan Teknik Pengambilan Sampel	65
4.3. Variable Penelitian	65
4.3.1. Klasifikasi Variabel	65
4.3.2. Definisi Operasional	66
4.4. Unit Analisis	67
4.5. Prosedur Penelitian	68
4.5.1. Hewan Coba	68
4.5.2. Isolat <i>T gondii</i>	68
4.5.3. Perlakuan	68
4.5.4. Penentuan Apoptosis Trofoblas dengan TUNEL ASSAY	68
4.5.5. Pengecatan Imunohistokimia	71
4.6. Analisis Data	72
KERANGKA OPERASIONAL PENELITIAN	73
BAB 5. HASIL PENELITIAN	74
5.1. Pemeriksaan Titer Antibodi terhadap <i>T. gondii</i>	74
5.2. Pemeriksaan Parasitologis pada Mencit Terinfeksi <i>T. gondii</i>	74
5.3. Respons Inflamasi Plasenta pada Mencit Bunting yang Diinfeksi dengan <i>T. gondii</i>	76
5.4. Pola Respons Inflamasi Plasenta Mencit Pengaruh Infeksi <i>T. gondii</i>	87
5.4.1. Pola Respons Inflamasi Plasenta Mencit Terinfeksi <i>T. gondii</i> pada Umur Kebuntingan Minggu Pertama	87
5.4.2. Pola Respons Inflamasi Plasenta Mencit Terinfeksi <i>T. gondii</i> pada Umur Kebuntingan Minggu Kedua	89
5.4.3. Pola Respons Inflamasi Plasenta Mencit Terinfeksi <i>T. gondii</i> pada Umur Kebuntingan Minggu Ketiga	89
BAB 6 PEMBAHASAN	92
6.1. Rancangan Penelitian	92
6.2. Pengaruh Infeksi <i>Toxoplasma gondii</i> terhadap Respons Inflamasi Plasenta	92
6.3. Pola Respon Inflamasi Pengaruh Infeksi <i>T. gondii</i>	103
6.3.1. Pola Respons Inflamasi Plasenta Mencit Terinfeksi <i>Toxoplasma gondii</i> pada umur Kebuntingan Minggu Pertama	104
6.3.2. Pola Respons Inflamasi Plasenta Mencit Terinfeksi <i>Toxoplasma gondii</i> Pada Umur Kebuntingan Minggu Kedua	106
6.3.3. Pola Respons Inflamasi Plasenta Mencit Terinfeksi <i>Toxoplasma gondii</i> Pada Umur Kebuntingan Minggu Ketiga	107
6.4. Mekanisme Apoptosis Trofoblas Pada Mencit yang Terinfeksi <i>T. gondii</i>	111
6.4 Temuan Baru	119
BAB 7 KESIMPULAN DAN SARAN	122

7.1. KESIMPULAN	122
7.2. SARAN	123
DAFTAR PUSTAKA	125
LAMPIRAN	141



DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 1. Siklus hidup <i>Toxoplasma</i>	11
Gambar 2. Jalur alternatif induksi sintesis IFN- γ	18
Gambar 3. Diagram Jalur Apoptosis	37
Gambar 4. Apoptosis yang diperantarai oleh Fas	40
Gambar 5. Apoptosis yang diperantarai oleh TNFR-1	41
Gambar 6. Kerangka Konseptual Penelitian	62
Gambar 7. Skema Pola Rancangan Penelitian	64
Gambar 8. Takizoit <i>T. gondii</i> dalam Cairan Peritoneal Mencit	76
Gambar 9. Rerata persentase jumlah limfosit desidua yang menghasilkan IFN- γ , persentase jumlah makrofag desidua yang menghasilkan TNF- α , persentase jumlah sel trofoblas yang mengekspresikan Fas, persentase jumlah sel trofoblas yang mengekspresikan TNFR-1 dan indeks apoptosis trofoblas	79
Gambar 10. Limfosit desidua mencit penghasil IFN- γ	81
Gambar 11. Makrofag desidua yang menghasilkan TNF- α	82
Gambar 12. Sel trofoblas yang mengekspresikan Fas	84
Gambar 13. Sel trofoblas yang mengekspresikan TNFR-1	85
Gambar 14. Trofoblas Mencit Terinfeksi <i>T. gondii</i> yang Mengalami Apoptosis	86
Gambar 15. Pola Respons Inflamasi Plasenta Mencit Terinfeksi <i>T. gondii</i> pada Umur Kebuntingan Minggu Pertama	88
Gambar 16. Pola Respons Inflamasi Plasenta Mencit Terinfeksi <i>T. gondii</i> pada Umur Kebuntingan Minggu Kedua	90
Gambar 17. Pola Respons Inflamasi Plasenta Mencit Terinfeksi <i>T. gondii</i> pada Umur Kebuntingan Minggu Ketiga	91
Gambar 18. Kerangka Konseptual Hasil Penelitian	121

DAFTAR TABEL.

	Halaman
Tabel 1. Rerata dan Simpangan Baku serta Hasil Uji Beda Jumlah Takizoit <i>T. gondii</i> dalam Cairan Peritoneal Mencit	75
Tabel 2. Rerata dan Simpangan Baku serta Hasil Uji Beda Respons Inflamasi Plasenta Mencit yang terinfeksi dan tidak terinfeksi	77
Tabel 3. Rerata dan Simpangan Baku serta Hasil Uji Beda (LSD) Respons Inflamasi Plasenta Mencit Tidak terinfeksi dan Terinfeksi pada Umur Kebuntingan Minggu Pertama, Kedua dan Ketiga	78
Tabel 4. Hasil analisis diskriminan respons inflamasi plasenta mencit terinfeksi <i>T. gondii</i> pada umur kebuntingan minggu pertama	88
Tabel 5. Hasil analisis diskriminan respons inflamasi plasenta mencit terinfeksi <i>T. gondii</i> pada umur kebuntingan minggu Kedua	89
Tabel 6. Hasil analisis diskriminan respons inflamasi plasenta mencit terinfeksi <i>T. gondii</i> pada umur kebuntingan minggu ketiga	91



DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran 1. Hasil Pemeriksaan Titer Antibodi Anti- <i>Toxoplasma gondii</i> pada Mencit Sebelum Perlakuan	141
Lampiran 2. Perhitungan Besar Sampel	142
Lampiran 3. Data	144
1. Data Jumlah Takizoit <i>T. gondii</i> dalam Cairan Peritoneal Mencit Terinfeksi Pada Umur Kebuntingan Minggu Pertama, Kedua dan Ketiga	144
2. Data Indeks Apoptosis Trofoblas, Persentase limfosit Desidua Penghasil IFN- γ , Persentase makrofag Desidua Penghasil TNF- α , Persentase Sel Trofoblas yang mengekspresikan Fas dan TNFR1	145
Lampiran 4. Perhitungan Uji Beda Jumlah Takizoit <i>T. gondii</i> dalam Cairan Peritoneal Mencit	146
Lampiran 5. Perhitungan Multivariat Uji Beda Respon Inflamasi Plasenta Pengaruh Infeksi <i>T. gondii</i>	148
Lampiran 6. Analisis Diskriminan.	157
1. Respon Inflamasi Plasenta Mencit Yang Diinfeksi <i>T.gondii</i> Pada Kebuntingan Minggu Pertama	157
2. Respon Inflamasi Plasenta Mencit Yang Diinfeksi <i>T.gondii</i> Pada Kebuntingan Minggu Kedua	163
3. Respon Inflamasi Plasenta Mencit Yang Diinfeksi <i>T.gondii</i> Pada Kebuntingan Minggu Ketiga	169
Lampiran 7 Ethical Clearence	175

DAFTAR SINGKATAN

AICD	Activation-induced cell death
AIDS	Acquired immune deficiency syndrome
APC	Antigen presenting cell
Bag	Bradizoit antigen
Caspase	Cysteine aspartyl-specific protease
CD..	Cluster of differentiation ..
CF	Complement fixation
CNS	Central Nervous System
CSF	Colony stimulating factors
CTL	Cytotoxic T lymphocyte
DA	Direct Agglutination
DD	Death domain
DED	Death effector domain
DFF	DNA fragmentation factor
DT	Dye test
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
Erk	Extracellular signal regulated kinase
ESA	Excreted-secreted antigens
DISC	Death-inducing signaling complex
FADD	Fas-associated death domain
FLIP	Flice-inhibitory protein
FLIPI	Flice-inhibitory protein long
FLIPs	Flice-inhibitory protein short
cFLIP	Cellular flice-inhibitory protein
HCG	Human chorionic gonadotropin
HCMV	Human cytomegalovirus
HRPE	Human retinal pigment epithelial
Hsp	Heat-shock protein
IFA	Indirect fluorescent Antibody
IFN- γ	Interferon-gamma
Ig	Immunoglobulin
IHA	Indirect haemagglutination
I κ B	Inhibitor kappa beta
IL-..	Interleukin-..
ICM	Inner mast cell
ISAGA	Immunosorbent agglutination assay
IUGR	Intrauterine growth restriction
LGL	Large granular lymphocyte
LSD	Least significant different
MANOVA	Multiple Analysis of Variants
MHC	Major histocompatibility complex
NF- κ B	Nocleus factor kappa beta
NK	Natural killer cell
NO	Nitric oxide
NOS	Nitric oxide synthase

P30	Protein 30 kilo Dalton
PABA	Para-aminobenzoic acid
PARP	Poly (ADP-ribose) polymerase
PCR	Polymerase chain reaction
PIBF	Progesterone-induced blocking factor
PMSG	Pregnant mare serum gonadotropin
RF1.P	Restriction Fragment Length Polymorphism
RIP	Receptor interactive protein
ROP	Ropthry
SAG..	Surface antigen ..
TGF β	Transforming growth factor beta
Th	Sel T helper ..
TNF-α	Tumor necrosis faktor alpha
TNFR..	Tumor necrosis faktor receptor ..
TRADD	TNFR-associated death domain
TRAF..	TNF-R-associated factor-
vFLIP	Virus flice-inhibitory protein



BAB 1

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang Masalah

Peningkatan apoptosis trofoblas merupakan keadaan patologis dan merupakan ciri dari penolakan trofoblas sehingga dapat menyebabkan kegagalan kebuntingan, antara lain berupa abortus, lahir mati dan berat lahir ringan (Aschkenazi *et al.*, 2002; Smith *et al.*, 1997c). Pada kasus infeksi *Toxoplasma gondii* juga terjadi kelainan kebuntingan berupa: resorpsi fetus, abortus, lahir mati, kematian bayi, lahir lemah dan kelainan kongenital, tergantung pada umur kebuntingan saat mendapatkan infeksi (Dubey *et al.*, 1998; Dupouy-Camet, 2002; Ghaffar, 2001; *Pediatric Database*, 1994; Weissmann, 2003; Wyler, 1990). Kegagalan kebuntingan karena infeksi *T. gondii* bukan hanya karena fetus terinfeksi (tertular) (Jenum *et al.*, 1998), tetapi lebih karena pengaruh tidak langsung dari aspek imunobiokemis berupa peningkatan IFN- γ , aktivitas caspase-3 dan apoptosis trofoblas (Sardjono, 2005) dan dalam peristiwa tersebut respons imun terhadap *T. gondii* memegang peranan penting (Denkers dan Gazzinelli, 1998). Sampai saat ini mekanisme peningkatan apoptosis trofoblas akibat infeksi *T. gondii* yang mendasari abortus belum jelas.

Secara umum infeksi *T. gondii* bersifat asimtomatis, tetapi secara serologis prevalensi toxoplasmosis cukup tinggi, baik pada manusia maupun hewan. Di atas telah diuraikan resiko infeksi *T. gondii*. Menurut Ghaffar (2001) kejadian infeksi kongenital karena *T. gondii* sekitar 1-5 per 1000 wanita hamil, kejadian abortus 5-10%, 8-10% mengakibatkan kerusakan otak dan mata yang serius dan 10-13% bayi akan mengalami gangguan penglihatan. Lima puluh delapan sampai tujuh

puluh persen wanita yang terinfeksi melahirkan bayi terlihat normal saat kelahiran, tetapi setelah anak berumur beberapa bulan sampai beberapa tahun akan menunjukkan gejala berupa retardasi mental, kelainan mata ringan sampai buta dan hidrocefalus (Dupouy-Camet, 2002; Ghaffar, 2001). Pada penderita AIDS, infeksi *Toxoplasma* menyebabkan ensefalitis fatal (Wyler, 1990). Selain resiko tersebut, kerugian secara ekonomis yang ditimbulkan akibat toxoplasmosis kongenital ini cukup besar. Perkiraan kerugian secara ekonomis dipaparkan oleh Robert dan Frenkel (1990) sebagai berikut: kehilangan *income* per kapita beberapa negara berkisar \$ 0,2 - 5.8 trilyun. Estimasi kehilangan biaya untuk perawatan dan biaya pendidikan anak yang terlahir dengan toxoplasmosis kongenital antara \$ 116 juta sampai \$ 2,8 trilyun dan estimasi biaya pengobatan kelainan mata kongenital antara \$ 368 juta sampai \$ 8,7 trilyun.

Di dunia peternakan, infeksi *T. gondii* juga banyak menimbulkan masalah berupa kelainan patologis fetus dan infeksi *T. gondii* merupakan penyebab utama kejadian abortus kambing serta domba (Dubey *et al.*, 1998). Kelainan patologis fetus berhubungan dengan umur kebuntingan saat terinfeksi, dan kelainan tersebut dapat berupa resorpsi fetus, mumifikasi fetus, abortus, lahir mati, dan lahir lemah (Weissmann, 2003). Frekuensi kejadian abortus dan kematian fetus dari induk domba yang terinfeksi *T. gondii* cukup tinggi, kejadian anak domba lahir dalam keadaan hidup jarang terjadi (Duncanson *et al.*, 2001). Menurut Dubey dan Kirkbirde (1990), 65% dari 1564 ekor domba di Amerika Utara yang diperiksa positif toxoplasmosis dan lebih dari 25% domba mengalami abortus. Menurut Spronk (2000), dalam satu kelompok kawanan domba, kejadian abortus akibat infeksi *T. gondii* berkisar 5-50%, sehingga mengakibatkan penurunan panen 15-

20 %. Kejadian abortus pada ternak menyebabkan penurunan populasi ternak, sehingga pemenuhan akan kebutuhan hasil dari ternak tidak tercukupi dan menimbulkan kerugian secara ekonomis bagi peternak.

Kejadian toxoplasmosis di Indonesia, baik pada manusia maupun hewan sangat bervariasi. Menurut hasil rangkuman Dachlan (1999), secara serologis prevalensi toksoplasmosis pada manusia berkisar antara 2-63% dan menurut beberapa peneliti, secara serologis kejadian toxoplasmosis pada kambing yang dipotong di RPH Tuban, Jawa Timur, 20,6% (Maslachah, 1996), di RPH Surabaya 42,4% dan di Malang 40% (Sasmita, 1991), kambing yang dijual sebagai sate di Surabaya 46% (Suprihati dkk., 1998). Secara parasitologis, 20%-40% daging kambing dan 30% ayam di pasar Surabaya positif mengandung kista jaringan (Mufasirin dan Suwanti, 2001; Suwanti dkk., 2003)

Mengingat kerugian yang ditimbulkan cukup besar dan kasus toxoplasmosis di Indonesia cukup tinggi maka sangat diperlukan usaha pengendalian meliputi pencegahan dan pengobatan. Menurut Holliman *et al.* (1995), pilihan pencegahan termasuk pendidikan kesehatan, imunisasi dan *screening* terhadap ibu hamil dan bayi memerlukan biaya cukup banyak sedangkan menurut Abholz (1993), biaya yang dikeluarkan untuk program *screening* jauh lebih tinggi dibandingkan dengan keuntungan yang diperoleh. Sedangkan efektifitas pengobatan dari berbagai penelitian memberikan hasil yang tidak sama (Rev. Wallon *et al.*, 1999). Bersumber dari penelitian mulai tahun 1966-1995 diperoleh hasil dua versi yang kontradiktif. Pertama, pengobatan efektif menurunkan penularan dari ibu ke anak dan kedua, pengobatan tidak efektif. Menurut Sciammarella (2001), pengobatan prenatal masih mempunyai peluang terjadi penularan kongenital sebesar 25%.

Dari data tersebut dapat diartikan bahwa pengobatan masih perlu dievaluasi. Untuk kesuksesan pengobatan dan pencegahan tentu diperlukan pengetahuan mengenai penyakit, penyebab dan kondisi pasien, termasuk mekanisme imunopatogenesis khususnya mekanisme apoptosis trofoblas akibat infeksi *Toxoplasma* pada saat kebuntingan. Menurut Dupouy-Camet (2002) imunopatogenesis toxoplasmosis selama kebuntingan belum sepenuhnya dipahami.

Sampai saat ini kajian apoptosis akibat infeksi *Toxoplasma* yang pernah dilaporkan lebih banyak pada penelitian *in vitro* (Channon *et al.*, 2002; Goebel *et al.*, 1999; Goebel *et al.*, 2001; Hisaeda *et al.*, 1997; Nash *et al.*, 1998; Wei *et al.*, 2002). Semua penelitian *in vitro* tersebut bertujuan untuk mengetahui pengaruh infeksi *T. gondii* terhadap hambatan apoptosis sel terinfeksi, karena *T. gondii* mempertahankan diri dengan cara menghindari apoptosis sel terinfeksi. Apoptosis justru lebih banyak terjadi pada sel yang tidak terinfeksi, sedangkan kematian sel terinfeksi lebih banyak secara nekrosis (Mordue *et al.*, 2001). Penelitian pengaruh infeksi *T. gondii* terhadap apoptosis secara *in vivo* yang pernah dilaporkan meliputi: apoptosis di limpa (Gavrilescu dan Denkers, 2001; Khan *et al.*, 1996; Mordue *et al.*, 2001), hati (Mordue *et al.*, 2001), otak (Deckert-Schlüter *et al.*, 1998; Shen *et al.*, 2001; Schlüter *et al.*, 2002), intestinal (Liesenfeld *et al.*, 1996), mata (Hu *et al.*, 1999; Shen *et al.*, 2001). Sedangkan laporan kajian infeksi *T. gondii* yang berhubungan dengan histopatologis uterus dan plasenta yang pernah dilakukan kebanyakan tidak mengamati kematian sel secara apoptosis tetapi nekrosis. Penelitian tersebut menggunakan hewan coba babi, domba, kambing dan kucing. (Buxton dan Finlayson, 1986; Dubey *et al.*, 1990; Dubey *et al.*, 1996;

Haskell, 2001) Baru pada tahun 2005 terungkap bahwa infeksi *T. gondii* berpengaruh terhadap apoptosis trofoblas (Sardjono, 2005). Dikatakan bahwa apoptosis trofoblas berhubungan tidak langsung dengan peningkatan IFN- γ dalam serum. Perubahan lingkungan mikro (lokal) di plasenta akibat infeksi *T. gondii* yang langsung berhubungan dengan peningkatan apoptosis trofoblas belum pernah dilaporkan.

Meskipun menurut Mordue *et al.* (2001) apoptosis lebih bersifat konsekuensi sekunder dari patogenesis infeksi *T. gondii*, tetapi menurut peneliti, apoptosis pada trofoblas akibat infeksi *T. gondii* perlu dikaji karena justru konsekuensi tersebut kemungkinan membawa dampak penolakan trofoblas oleh respons imun maternal sehingga dapat menyebabkan komplikasi kebuntingan. Melalui paradigma imunopatobiologi diharapkan dapat mengungkap efek infeksi *T. gondii* terhadap respons inflamasi plasenta dan mekanisme peningkatan apoptosis trofoblas akibat infeksi *T. gondii* pada mencit bunting.

T. gondii adalah protozoa intraseluler obligat, seperti patogen intraseluler lainnya, *T. gondii* membangkitkan respons imun seluler lebih dominan dibanding dengan respon humoral (Denkers dan Gazzinelli, 1998; Johnson, 1990). Kemampuan *T. gondii* membangkitkan respons imun seluler dicirikan dengan respons yang kuat ke arah Th1 yang ditandai dengan produksi sitokin Th1 antara lain IFN- γ dan IL-2. Respons tersebut diperlukan oleh induk semang untuk bertahan hidup melawan infeksi *T. gondii*. Peningkatan IFN- γ dimaksudkan untuk membunuh parasit, tetapi peningkatan sitokin Th1 tersebut justru merugikan bagi fetus karena induksi respons sitokin Th1 yang kuat pada *fetal-maternal interface* menyebabkan penolakan fetus. (Peltier, 2003; Wegmann *et al.*, 1993) Pada infeksi

T. gondii, IFN- γ tidak hanya dihasilkan oleh Th1 saja tetapi juga oleh sel NK dan sel T sitolitik (sel T CD8+) (Denkers dan Gazzinelli, 1998). Menurut hasil review Denkers dan Gazzinelli (1998) makrofag yang terinfeksi *T. gondii* memproduksi IL-12 yang dapat mengaktifkan sel NK untuk memproduksi IFN- γ dan diferensiasi limfosit T *helper* (Th) menjadi sel Th1. Sel Th 1 memproduksi IFN- γ dan IL-2. Makrofag sebagai APC mengekspresikan MHC I sehingga ditangkap oleh reseptor sel T CTL. Sitokin IL-2 yang dihasilkan mendorong sel T CTL untuk memproduksi IFN- γ . *T. gondii* menginfeksi semua tipe sel (Dubey *et al.*, 1998; Johnson, 1990) termasuk berbagai sel di uteroplasenta, maka diasumsikan reaksi seluler akibat infeksi *T. gondii* juga terjadi di uteroplasenta. Populasi leukosit di uteroplasenta adalah makrofag, sel NK, sel T CTL (sel T CD8+) dan sel T CD4+ (Th) (Vince dan Johnson, 2000) dan diperkirakan aktivasi sel tersebut menyebabkan apoptosis trofoblas. Hal ini didasarkan pada pendapat Olivares *et al.* (2002) bahwa limfosit desidua yang teraktivasi dapat memicu apoptosis trofoblas dan mengakibatkan abortus. Aktivasi leukosit desidua oleh infeksi *T. gondii* diperkirakan berhubungan dengan peningkatan apoptosis trofoblas.

Apoptosis trofoblas akibat infeksi *T. gondii* diperkirakan melalui dua jalur. Produksi IFN- γ oleh berbagai sel di uteroplasenta (sel NK, CTL dan Th1) akan memicu makrofag memproduksi TNF- α . Menurut Baines (2002), pada keadaan infeksi sel NK uterus teraktivasi menghasilkan IFN- γ dan IFN- γ yang dihasilkan sel NK memicu makrofag memproduksi TNF- α . Peningkatan ekspresi TNF- α di uteroplasenta memicu kematian plasenta (Gorivodsky *et al.*, 1998) dan kematian plasenta terjadi secara apoptosis, karena TNF- α (sebagai ligan) dapat memicu apoptosis sel dengan cara mengaktifkan reseptor TNF satu (TNFR-I) permukaan

membran (Rayet *et al.*, 1998) yang dimiliki trofoblas (Dumur *et al.*, 2001; Phillips *et al.*, 2001). Ikatan TNF- α dengan TNFR-I yang dimiliki trofoblas mengakibatkan trofoblas mengalami apoptosis.

Jalur kedua melalui ikatan Fas dan Fas Ligan. IL-2 yang dihasilkan Th1, mengaktifkan sel T CTL dan sel NK desidua mengekspresikan Fas Ligan (Goldsby *et al.*, 2000). Ikatan Fas Ligan sel T dan NK dengan Fas yang dimiliki oleh trofoblas memicu kejadian apoptosis trofoblas (Dumur *et al.*, 2001; Phillips *et al.*, 2001). Dalam keadaan kebuntingan normal, trofoblas mengekspresikan Fas dalam kadar yang sangat rendah dan tahan terhadap induksi apoptosis, tetapi keberadaan IFN- γ dan TNF- α di lingkungan mikro plasenta, sebagai respons imun terhadap infeksi *T. gondii*, akan meningkatkan ekspresi Fas dan trofoblas menjadi lebih peka terhadap induksi apoptosis oleh Fas (Aschkenazi *et al.*, 2002, Balkundi, *et al.*, 2003).

Kadar hormon steroid, terutama estrogen dan progesteron, meningkat secara tajam selama kebuntingan. Estrogen dan progesteron diproduksi oleh plasenta. Pada awal kebuntingan, progesteron diproduksi oleh corpus luteum, tetapi pada kebuntingan lanjut produksi progesteron didominasi oleh plasenta. Sejalan dengan umur kebuntingan produksi progesteron dan estrogen meningkat secara bertahap sampai masa akhir kebuntingan. Konsekuensi dari peningkatan ini membawa pengaruh besar terhadap sistem imun maternal, baik respons imun adaptif maupun alami. Kedua hormon tersebut menekan sel imun seperti sel NK dan sel T. Estrogen menekan aktivitas sitolitik sel NK. Progesteron menekan aktivitas sitolitik NK, menurunkan jumlah sel NK, menghambat aktivitas sitolitik limfosit T, menghambat proliferasi limfosit T, menghambat perkembangan sel

Th1 dan meningkatkan perkembangan sel Th2. (Dosiou dan Giudice, 2005; Roberts *et al*, 2001, Spencer, 2004)

1.2 Rumusan Masalah

Dari uraian di atas dapat ditarik rumusan masalah sebagai berikut:

Apakah terdapat perbedaan respons inflamasi plasenta antara mencit yang diinfeksi *T. gondii* dengan mencit yang tidak diinfeksi, baik pada umur kebuntingan minggu pertama, kedua maupun ketiga, berdasarkan pada peningkatan persentase jumlah limfosit desidua penghasil IFN- γ , persentase jumlah makrofag desidua penghasil TNF- α , persentase jumlah trofoblas yang mengekspresikan Fas dan TNFR-1 serta indeks apoptosis trofoblas?

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan umum

Mengungkap mekanisme peningkatan apoptosis trofoblas akibat infeksi *T. gondii* pada mencit bunting.

1.3.2 Tujuan khusus

1. Membuktikan terdapat perbedaan respons inflamasi plasenta antara mencit yang diinfeksi *T. gondii* dengan mencit yang tidak diinfeksi baik pada umur kebuntingan minggu pertama, kedua maupun ketiga, berdasarkan pada peningkatan persentase jumlah limfosit desidua penghasil IFN- γ , persentase jumlah makrofag desidua penghasil TNF- α ,

persentase jumlah trofoblas yang mengekspresikan Fas dan TNFR-1 serta indeks apoptosis trofoblas.

2. Mengetahui pola respons inflamasi plasenta mencit terinfeksi *T. gondii* pada umur kebuntingan minggu pertama, kedua dan ketiga.

1.4 Manfaat Penelitian

1.4.1 Manfaat teoritis

Hasil penelitian ini diharapkan menambah informasi mengenai :

1. Mekanisme peningkatan apoptosis trofoblas karena infeksi *T. gondii* pada mencit bunting.
2. Pengaruh infeksi *T. gondii* terhadap respons inflamasi plasenta dan pola respons inflamasi plasenta yang terbentuk.

1.4.2 Manfaat praktis

Peningkatan apoptosis trofoblas merupakan keadaan patologis dan merupakan ciri dari penolakan trofoblas sehingga dapat menyebabkan komplikasi kebuntingan berupa abortus, lahir mati dan berat lahir ringan, sehingga dengan pemahaman mekanisme peningkatan apoptosis trofoblas pada kasus toxoplasmosis dapat dijadikan dasar pengembangan diagnosis dini dan pencegahan komplikasi kebuntingan pada penderita toxoplasmosis baik pada manusia maupun ternak.

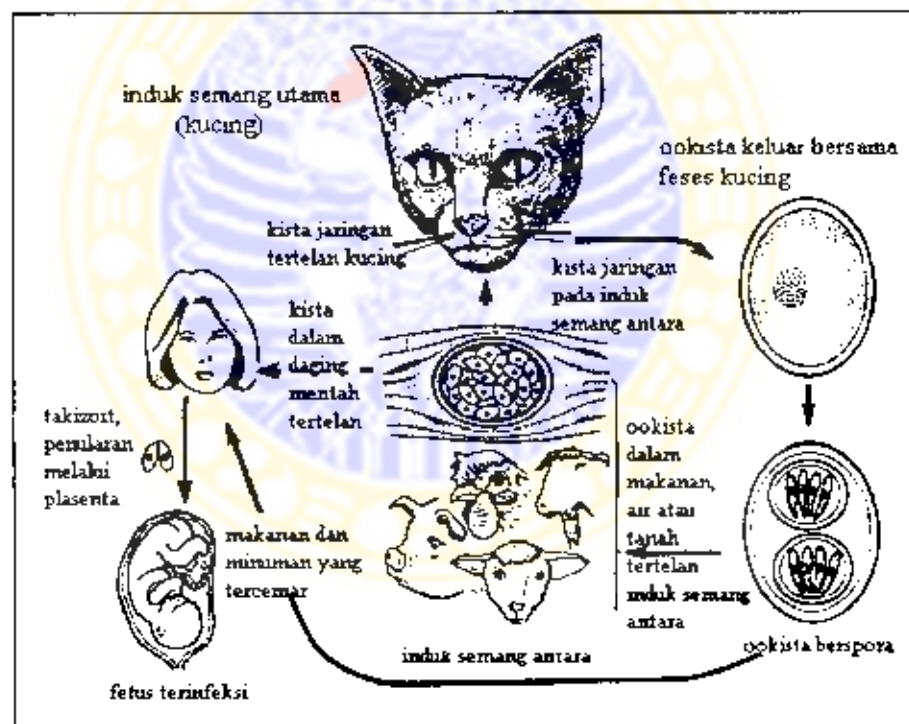
BAB 2**TINJAUAN PUSTAKA****2.1 Infeksi *Toxoplasma gondii*****2.1.1 *Toxoplasma gondii***

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

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

2.1.2 Morfologi dan siklus hidup *Toxoplasma gondii*

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



Gambar 1 Siklus hidup *Toxoplasma gondii*. (Dubey *et al.*, 1998)

Kucing merupakan induk semang utama sedangkan hewan lain dan manusia sebagai induk semang antara. Gambar 1 menunjukkan siklus hidup dari *T gondii*.

Induk semang terinfeksi karena menelan stadium kista dalam daging hewan terinfeksi atau ookista yang keluar bersama feses kucing. (Dubey *et al.*, 1998; Frenkel, 1990)

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



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

Takizoit merupakan stadium proliferasi. Pada stadium ini parasit berkembang sangat cepat dan biasanya terjadi pada saat penyakit berjalan akut dan mampu menembus semua tipe sel. Pada keadaan akut, ditandai dengan penyebaran dan pertumbuhan takizoit di intraseluler berbagai organ induk semang (Channon *et al.*, 2000). Menurut Grimwood dan Smith (1992), dalam tubuh induk semang, infeksi meluas karena peranan stadium takizoit dan stadium ini dikenal sebagai stadium invasif. Dikatakan selanjutnya bahwa peristiwa invasi takizoit ke dalam sel induk semang melibatkan perlekatan parasit pada membran sel induk semang dan diikuti dengan pembentukan jembatan penghubung (*Intimate junction*). Interaksi antara membran induk semang dan parasit merupakan peristiwa penting pada proses invasi. Molekul permukaan parasit merupakan determinan dan terlibat pada proses pengenalan dan perlekatan parasit pada membran sel induk semang. Molekul tersebut antara lain P30 atau SAG1. SAG1 mempunyai peranan penting dalam invasi parasit masuk ke dalam sel induk semang, hal ini dibuktikan dengan reaksi netralisasi dengan antibodi monoklonal terhadap SAG1 akan menghalangi invasi *T. gondii* (Grimwood dan Smith, 1996).

Respons imun induk semang akan memicu perubahan bentuk takizoit menjadi bradizoit. Perubahan ini juga tergantung lingkungan yang memicu, seperti: pH, temperatur, induksi *heat-shock protein* (hsp), *nitric oxide* (NO) dan TNF- α (Smith *et al.*, 1997a). Bradizoit secara lambat membelah dan berakumulasi dalam jumlah banyak membentuk suatu kista. Kista dapat diketemukan pada berbagai jaringan terutama di otak dan otot. Dalam sel induk semang, takizoit dan bradizoit berada dalam vakuola parasitofora. Perkembangbiakan kedua stadium tersebut terjadi secara endodiogeni.

Bradizoit merupakan stadium istirahat. Pada stadium ini parasit tahan terhadap enzim pencernaan. Perubahan dari stadium takizoit menjadi bradizoit merupakan aspek penting dalam patogenesis toxoplasmosis. Oleh Bohne *et al.* (1995) ditemukan bahwa gen yang berperan pada perubahan takizoit menjadi bradizoit adalah gen *hsp30/bag1*. Gen tersebut hanya terekspresi pada bentuk bradizoit dan bukan pada takizoit. Hal ini juga dibuktikan dengan pemberian protein *hsp30/bag1* pada mencit, daya tahan hidup mencit meningkatkan karena terjadi pembentukan kista *T. gondii* lebih cepat (Mun *et al.*, 1999).

2.1.3 Sumber infeksi dan cara penularan

Pada umumnya orang terinfeksi *T. gondii* karena menelan makanan atau minuman yang terkontaminasi ookista atau kista jaringan dalam daging ternak yang terinfeksi (Dubey *et al.*, 1998; Jonson, 1990). Kucing dapat mengeluarkan ookista dalam jumlah jutaan setelah memakan rodensia, burung dan hewan lain yang terinfeksi dan ookista yang keluar bersama feses kucing dapat tahan hidup beberapa bulan di tanah (Dubey, 2000).

Keberadaan parasit dalam daging merupakan perhatian khusus di bidang kesehatan masyarakat. Daging yang kurang masak merupakan salah satu sumber penularan pada manusia. Setengah dari kasus toxoplasmosis di Amerika Serikat disebabkan karena memakan daging yang terinfeksi (Jones, 2003). Menurut review Dubey (2000), *Toxoplasma*, *Listeria* dan *Salmonella* merupakan agen patogen penting yang ditularkan melalui makanan. Daging babi, domba dan binatang buruan merupakan sumber utama penularan *T. gondii*. Hasil penelitian Cook *et al.* (2000) membuktikan bahwa wanita hamil yang memakan daging mentah dari sapi, domba dan binatang buruan mempunyai resiko tinggi terinfeksi *T. gondii*.

Meskipun di Indonesia belum ada laporan hubungan antara penderita dengan sumber penularan tetapi perlu diwaspadai kemungkinan keberadaan faktor resiko penularan. Hal ini karena dari beberapa sigi toxoplasmosis, kucing dan ternak terbukti terinfeksi *Toxoplasma* baik secara serologis maupun parasitologis. Beberapa ternak yang telah terbukti terinfeksi antara lain: kambing (Maslachah, 1996; Sasmita, 1991; Suprihati dkk., 1998; Mufasirin dkk, 2000; Mufasirin dan Suwanti, 2001), babi (Sasmita, 1991) dan ayam (Hermawan dkk, 1988; Mufasirin dan Suwanti 2002; Suwanti dkk, 2003).

Selain secara peroral, penularan dapat secara transplasental. Pada penularan transplasental yang berperan adalah stadium takizoit. Penularan transplasental merupakan hal yang penting pada manusia dan domba, karena dapat menyebabkan abortus dan kelainan kongenital. Penularan stadium takizoit juga dapat melalui luka. (Dubey *at al.*, 1998; Frenkel, 1990)

2.1.4 Galur dan virulensi

Meskipun spesies *T. gondii* merupakan satu-satunya spesies yang patogen dari genus *Toxoplasma*, tetapi mempunyai berbagai variasi galur yang berhubungan dengan virulensi parasit. Galur yang pernah dilaporkan antara lain: RH, GT1, NED, Beverley, PD2, GAIL, GC dan 76K. Salah satu ciri karakteristik dari berbagai galur *Toxoplasma* terletak pada variasi dalam hal virulensinya. Sebagai contoh galur RH merupakan galur yang sangat virulen. Galur RH dapat mematikan mencit yang terinfeksi secara eksperimental kurang dari seminggu sedangkan kebanyakan galur yang diisolasi dari kasus toxoplasmosis kongenital atau dari hewan merupakan galur avirulen. Apabila galur avirulen diinfeksi pada mencit, menyebabkan penyakit kronis yang dicirikan dengan keberadaan kista pada otak. (Howe *et al.*, 1997)

Setelah dianalisis secara molekuler ternyata terdapat perbedaan isoensim antar galur dan sekurangnya ada 5 *zymodeme* sebagai penentu perbedaan galur. Isolat yang sangat patogen untuk mencit (contoh galur RH) memiliki *zymoeme* 1 atau 5. Isolat yang mengakibatkan penyakit kronis pada mencit mempunyai *zymodeme* 2 (contoh galur Prugnaud, 76K, Me49, dan Beverley), *zymodeme* 3 (contoh. C56) atau *zymodeme* 4. Isolat dari toxoplasmosis kongenital manusia mempunyai kelima (semua) *zymodeme* tersebut. (Dardé *et al.*, 1992)

Menurut data sekarang dengan RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) menunjukkan bahwa *T. gondii* berisi 3 klon garis keturunan yang diberi nama I, II dan III. Kelompok I berhubungan dengan *zymodeme* 1, kelompok II dengan *zymodeme* 2 & 4 dan kelompok III dengan *zymodeme* 3. Lebih dari 70% kasus toxoplasmosis pada manusia dihubungkan dengan galur

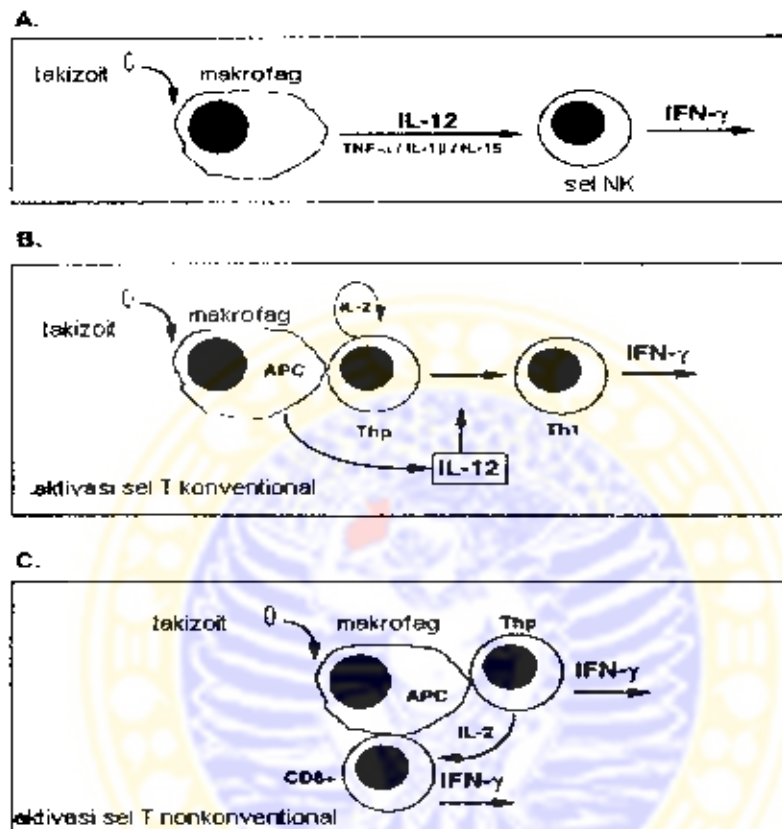
kelompok II (Howe *et al.*, 1997) Galur kelompok II ini juga banyak terjadi pada hewan seperti babi dan domba. Virulensi akut pada mencit terlihat pada kelompok I (Howe *et al.*, 1996). Selanjutnya oleh Howe *et al.* (1996) dikatakan bahwa virulensi akut pada mencit diregulasi oleh daerah yang berhubungan dengan lokus SAG1 pada kromosom VIII dari *T. gondii*.

Selain perbedaan isoensim, beberapa penulis menemukan perbedaan kemampuan ekspresi protein stress (*Heat shock protein/hsp*) yang berbeda antara *T. gondii* galur yang virulen dan avirulen. Hsp 70 kDa (*hsp70*) hanya dimiliki oleh galur virulen, sedangkan *hsp60* dimiliki baik oleh galur virulen maupun avirulen (Lyons dan Johnson, 1995) dan *hsp70* memainkan peranan penting virulensi *T. gondii* (Lyons dan Johnson, 1998). Dikatakan selanjutnya bahwa ekspresi *hsp70* diinduksi oleh stres imunologis dan protein ini memungkinkan galur virulen tetap sebagai takizoit tanpa membentuk kista seperti yang terjadi pada galur avirulen. Menurut Dobbin *et al.* (2002) ekspresi *hsp70* oleh *T. gondii* galur virulen, merupakan strategi pertahanan parasit menurunkan produksi NO oleh sel induk semang karena NO merupakan parasitidal.

2.1.5 Respons imun terhadap infeksi *T. gondii*

Infeksi *T. gondii* dapat membangkitkan respons imun induk semang terinfeksi baik secara humoral maupun seluler (Ghaffar, 2001; Johnson, 1990). Respons imun humoral ditunjukkan dengan pembentukan beberapa kelas antibodi spesifik dalam serum. Pada infeksi akut, baik pada manusia dan mamalia lain, ditandai dengan peningkatan secara signifikan antibodi IgA dan IgM spesifik

melawan komponen antigenik mayor P30 atau SGA1 (Joss, 1995 dalam Dupouy-Camet, 2002) dan pada fase infeksi kronis dicirikan dengan IgG spesifik.



Gambar 2: Jalur alternatif induksi sintesis IFN- γ (Denkers dan Gazzinelli, 1998).

- (A) *T. gondii* menginfeksi makrofag. Makrofag menghasilkan IL-12, TNF- α , IL-1 β , dan IL-15. Sitokin tersebut menginduksi sel NK menghasilkan IFN- γ , yang dapat mendorong aktivasi makrofag dan meningkatkan aktivitas mikrobiostatik makrofag.
- (B) *T. gondii* menginfeksi makrofag (APC). APC mempresentasi peptida parasit sel T helper. Interleukin-2 dari sel Th dan IL-12 dari APC mendorong diferensiasi dari Th ke Th1. Th1 menghasilkan IFN- γ .
- (C) *T. gondii* mampu mengaktifkan sel T tanpa memerlukan IL-12.

T. gondii merupakan parasit intraseluler obligat, seperti patogen intraseluler lainnya, *T. gondii* membangkitkan respons imun seluler lebih dominan dibanding respons humoral (Denkers dan Gazzinelli, 1998; Johnson, 1990). Kemampuan *T.*

gondii membangkitkan respons imun seluler dicirikan dengan respons yang kuat ke arah Th1 yang menghasilkan IFN- γ . Pada infeksi *T. gondii*, IFN- γ tidak hanya dihasilkan oleh Th1 saja tetapi juga oleh sel NK dan sel T sitolitik (sel T CD8⁺). Gambar 2 menunjukkan jalur alternatif sintesis IFN- γ yang dipicu oleh infeksi *T. gondii*. Ada 3 jalur alternatif sintesis IFN- γ . Pertama, pada awal infeksi, *T. gondii* pada makrofag merangsang makrofag memproduksi IL-12, TNF- α , IL-1 β , dan IL-15. Sitokin IL-12, bersama-sama dengan IL-1 β , IL-15 dan TNF- α , merangsang sel NK untuk memproduksi IFN- γ . Sitokin IFN- γ yang dihasilkan sel NK mengaktifkan makrofag TNF- α . Sitokin IFN- γ bekerja secara sinergis dengan TNF- α menginduksi ekspresi iNOS, yang menghasilkan NO untuk membunuh *T. gondii* intraseluler. Jalur kedua, pada tahap adaptif, infeksi *T. gondii* pada makrofag atau APC mendorong produksi IL-12. APC mempresentasi peptida parasit melalui MHC II sehingga dikenali oleh sel Th0 (sel T CD4⁺). Sel Th yang berikatan dengan MHC II memproduksi IL-2. Sitokin IL-2 dari sel Th dan IL-12 dari APC mendorong diferensiasi dari Th0 menjadi Th1. Sel Th1 menghasilkan IFN- γ . Jalur ketiga, makrofag atau APC yang terinfeksi mengekspresikan MHC I sehingga mampu dikenali oleh sel T CTL (sel T sitotoksik atau sel T CD8⁺). Ikatan sel T CTL dengan APC melalui MHC I dan keberadaan IL-2 yang dihasilkan sel Th memicu sel T CTL menghasilkan IFN- γ .

Pada infeksi kronis, kadar sitokin proinflamatori dari NK menurun, tetapi karena terdapat banyak populasi limfosit Th1 CD4⁺ dan sel T CD8⁺ T yang juga produksi IFN- γ maka kadar IFN- γ tetap tinggi dalam jangka waktu lama (review Denkers dan Gazzinelli 1998). Pendapat tersebut diperkuat oleh Prigione *et al.* (2000) telah mengkarakterisasi klon sel T yang spesifik terhadap antigen ekskresi-

sekresi (*Excreted-secreted antigens/ESA*) dari *T. gondii*. Sel tersebut adalah sel T CD4+. Dikatakan bahwa sel T CD4+ ini kemungkinan terlibat dalam pemeliharaan imunitas terhadap *T. gondii* dalam jangka waktu lama pada individu yang terinfeksi secara kronis.

Menurut hasil rangkuman Denkers dan Gazzinelli (1998), induk semang mampu bertahan terhadap infeksi *T. gondii* melalui dua fase. Pertama, fase awal (infeksi akut), pertumbuhan stadium takizoit dibatasi oleh IFN- γ yang produksinya diinduksi oleh interleukin 12 (IL-12). Pada fase ini sistem imunitas alami yang terlibat adalah makrofag dan sel NK. Makrofag yang terinfeksi takizoit *T. gondii* memproduksi IL-12. IL-12 menginduksi sel NK untuk memproduksi IFN- γ . Produksi IL-12 oleh makrofag merupakan mekanisme secara umum yang mendorong sintesis IFN- γ oleh sel NK. Kedua, selama infeksi kronis atau fase adaptif, limfosit T spesifik terhadap *T. gondii* mengeluarkan kadar IFN- γ dalam jumlah banyak, yang ditujukan untuk mencegah reaktivasi kista dan membersihkan takizoit dari jaringan induk semang. Sitokin IFN- γ , penting untuk aktivasi makrofag dan untuk mendorong fungsi makrofag sebagai mikrobisida. Makrofag yang teraktivasi akan menghasilkan TNF- α dan NO.

Produksi NO oleh makrofag yang teraktivasi IFN- γ sangat tergantung pada TNF- α (Langermans *et al.*, 1992). Pada model mencit, IFN- γ bersama dengan TNF- α menjadi perantara efek antiparasitik NO dengan cara meningkatkan pengaturan ekspresi *nitric oxide synthase* (NOS) dan produksi NO (Langermans *et al.*, 1992 dan Sibley *et al.*, 1991). NO tidak hanya bersifat toxoplasmisidal langsung, tetapi juga dapat mendorong perubahan takizoit menjadi bradizoit (Bohne *et al.*, 1994). Namun, pada infeksi secara intraperitoneal pengendalian

pertumbuhan awal *T. gondii* tidak tergantung pada produksi NO, tetapi justru NO penting bagi induk semang dalam mengendalikan parasit pada infeksi yang persisten (Khan *et al.*, 1998; Scharon Kersten *et al.*, 1997).

Pada stadium awal infeksi, tidak hanya produksi IFN- γ saja yang penting untuk pertahanan induk semang, tetapi pengaturan sel CD4+ juga merupakan saat penting dalam menentukan akibat penyakit. Hal ini dibuktikan dengan pemberian antibodi anti IFN- γ atau anti-sel CD4+ sebelum infeksi oral pada mencit akan meningkatkan kematian mencit sedangkan apabila pemberian antibodi tersebut dilakukan 4 hari setelah infeksi akan meningkatkan kelangsungan hidup mencit (Liesenfeld *et al.*, 1999 dan Liesenfeld *et al.*, 1996). Kepekaan mencit C57BL terhadap infeksi oral *T. gondii* dihubungkan dengan produksi IFN- γ yang tergantung sel T CD4+ (Liesenfeld *et al.*, 1996). Tetapi, perlindungan selama infeksi baik infeksi oral maupun parenteral juga dihubungkan dengan produksi IFN- γ oleh sel CD8+ (Chardes *et al.*, 1994; Gazzinelli *et al.*, 1991). Bukti IFN- γ mempunyai peranan penting melawan infeksi, ditunjukkan dengan penelitian pada mencit terinfeksi yang diobati dengan anti-IFN- γ atau mencit tidak mempunyai gen IFN- γ (*knock out*) bila diinfeksi dengan *T. gondii*, mencit akan mati (Sher *et al.*, 1995).

Selain IFN- γ , TNF- α juga merupakan sitokin penting yang diperlukan untuk pertahanan induk semang terhadap infeksi *T. gondii*. Kalau IFN- γ sangat diperlukan baik pada fase akut maupun kronis (Rev. Denkers dan Gazzinelli, 1998), tetapi TNF- α utamanya pada fase infeksi kronis, yaitu sewaktu berada pada sistem syaraf pusat (Deckert-Schluter *et al.*, 1998; Yap *et al.*, 1998).

Meskipun resistensi terhadap infeksi awal *T. gondii* tergantung pada produksi sitokin proinflamatori (produk dari sel Th1), untuk mengontrol pertumbuhan parasit, tetapi diperlukan pula sitokin regulator (sitokin produk sel Th2), untuk membatasi patologi induk semang (Alexander *et al.*, 1997; Denkers, 1999). Keseimbangan kedua sitokin ini sangat diperlukan. Hal ini dibuktikan beberapa penelitian yang menyimpulkan bahwa, pada mencit defisiensi sitokin Th2 (IL-4 atau IL-10), menunjukkan peningkatan kepekaan terhadap infeksi *T. gondii* akut (Gazzinelli *et al.*, 1996 dan Robert *et al.*, 1996). Selanjutnya dikatakan, sel Th2 berperan membatasi inflamasi khususnya pada saluran pencernaan (Chardes *et al.*, 1993). Ditunjukkan bahwa meskipun respons Th1 menonjol pada limpa mencit yang terinfeksi *T. gondii*, pada nodus limfatikus mesenterika mencit ada kecenderungan ke arah Th2. Menurut Mack dan McLeod (1992), IL-5 bersama *transforming growth factor* β (TGF β) dapat meningkatkan produksi immunoglobulin A (IgA) jaringan limfoid mukosa sedangkan anti-IgA *T. gondii* menghambat invasi parasit ke dalam enterosit *in vitro*. Pada infeksi parenteral, IL-5 memberikan perlindungan selama infeksi kronis tetapi tidak pada infeksi akut (Zhang dan Denkers 1999). IL-5 merupakan pengganggu pada awal stadium infeksi *T. gondii* secara peroral hal ini dihubungkan dengan peningkatan patologi usus halus, yaitu eosinofilia dan penurunan kadar IL-12 dan IFN- γ (Nickdel *et al.*, 2001).

2.1.6 Infeksi *T. gondii* pada saat kebuntingan

Secara umum infeksi *T. gondii* bersifat asimtomatis, tetapi apabila menginfeksi wanita hamil atau ternak bunting akan mengakibatkan resorpsi fetus,

abortus, lahir mati, kematian bayi dan kelainan kongenital berupa retardasi mental, kelainan mata ringan sampai buta dan hidrosefalus (Dubey *et al.*, 1998; Dupouy-Camet, 2002, Ghaffar, 2001). Kelainan kongenital terjadi karena toxoplasmosis dapat menular secara transplasental. Menurut Jenum (1998), resiko abortus, bukan hanya disebabkan fetus tertular (terinfeksi) Pendapat tersebut didasarkan pada hasil penelitian pada wanita hamil di Norwegia. Dari 868 wanita hamil yang mengalami abortus dan positif terinfeksi *T. gondii*, hanya tiga fetus yang positif tertular. Menurut Denkers dan Gazzinelli (1998) respons imun tersebut terlibat pada kejadian abortus pada wanita hamil atau hewan betina hunting yang terinfeksi *T. gondii* akut. Pendapat tersebut didukung oleh Sardjono (2005) yang melaporkan bahwa kegagalan kebuntingan pada mencit akibat infeksi *T. gondii* lebih disebabkan oleh pengaruh tidak langsung dari aspek imunobiokimia dari pada pengaruh langsung dari parasit. Aspek imunobiokimia yang dimaksudkan adalah peningkatan IFN- γ dalam serum, caspase-3 dan apoptosis trofoblas.

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

Pada domba, infeksi *T. gondii* sering mengakibatkan kegagalan reproduksi. Tingkat kejadian patologis tergantung pada umur kebuntingan saat mendapatkan

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

Angka penularan dan resiko abortus berhubungan dengan hormon kebuntingan. Hormon kebuntingan mempengaruhi sistem imun sedangkan sistem imun maternal juga berpengaruh terhadap kebuntingan. Kedua keadaan tersebut mempunyai dua konsekuensi penting pada infeksi parasitik. Pertama, hormon kebuntingan akan membantu daya hidup parasit sedangkan sitokin tipe 1 (Th1) justru akan mematikan parasit. Kedua, infeksi parasitik yang menginduksi respon tipe 1 (Th1) secara kuat akan berpengaruh buruk terhadap kebuntingan. Kedua skenario ini telah ditunjukkan pada parasit protozoa *T. gondii*, tetapi sejauh mana respons imun terhadap *T. gondii* berpengaruh negatif terhadap kebuntingan masih merupakan kontroversial (Roberts *et al.*, 2001). Hormon progesteron menyebabkan reaksi imun maternal bias ke arah Th2, yang menguntungkan bagi parasit untuk berkembang biak dan hidup lebih lama. Pada kebuntingan trimester pertama kadar progesteron rendah sehingga bias ke arah Th2 kecil. Jadi apabila terjadi infeksi pada trimester pertama dan kedua maka angka penularan ke fetus kecil, tetapi frekuensi kejadian abortus tinggi. Sebaliknya, infeksi pada trimester ketiga, di mana kadar progesteron meningkat maka terjadi bias ke arah Th2 lebih kuat akibatnya frekuensi penularan kongenital lebih tinggi, tetapi abortus tidak

terjadi karena sitokin Th2 berfungsi mempertahankan kebuntingan. (Roberts *et al.*, 2001; Thouvenin *et al.*, 1997)

Mencit bunting lebih peka terhadap infeksi *T. gondii* dan ditunjukkan dengan angka mortalitas lebih tinggi dibanding mencit tidak bunting (Shirahata *et al.*, 1992). Hal yang sama telah ditunjukkan oleh Thouvenin *et al.*, (1997). Mereka telah menggunakan model mencit untuk mempelajari respons imun pada kebuntingan dan hasil penelitian mereka menunjukkan bahwa mencit yang bunting lebih peka terhadap infeksi daripada yang tidak bunting. Hal ini tergambar dari jumlah parasit dalam paru-paru dan otak mencit bunting lebih banyak dibanding dari pada mencit tidak bunting. Peningkatan kepekaan mencit bunting terhadap infeksi *T. gondii* dihubungkan dengan penurunan kapasitas sitokin tipe 1, yang ditunjukkan dengan penurunan kemampuan produksi IFN- γ (Shirahata *et al.*, 1992). Pemberian sitokin tipe 1, seperti IFN- γ dan IL-2, terhadap mencit bunting yang diinfeksi *T. gondii* meningkatkan daya hidup mencit tersebut (Shirahata *et al.*, 1993). Sitokin tipe Th1, terutama IFN- γ , bertanggung jawab untuk membunuh parasit intraseluler (Berger, 2000), termasuk *T. gondii*. Penelitian Mack dan Jaffe (2001) mempertegas bahwa IFN- γ dan IL-12 secara *in vitro* menghambat pertumbuhan *T. gondii* dan secara *in vivo* meningkatkan daya tahan mencit

Beberapa peneliti telah memaparkan pengaruh sitokin Th2 terhadap infeksi *T. gondii*. Thouvenin *et al.* (1997) menggunakan mencit yang tidak mempunyai IL-4 telah membuktikan bahwa IL-4 berperan pada terjadinya penularan transplasental. Sedangkan pengaruh IL-6 terhadap infeksi *T. gondii* telah dibuktikan oleh Beaman *et al.* (1994), dikatakan bahwa IL-6 akan

meningkatkan replikasi intraseluler dari *T. gondii*. Penelitian tersebut dilakukan secara *in vitro*, tetapi pembuktian secara *in vivo* belum pernah dilakukan. Pada penelitian *in vitro*, TGF- β meningkatkan proliferasi *T. gondii* dalam kultur sel epitel pigmen retina manusia (*human retinal pigment epithelial/HRPE*) (Naginei *et al.*, 2002) dan pada penelitian *in vivo* menggunakan mencit imunodefisiensi (mencit SCID) membuktikan bahwa TGF- β menghambat produksi IFN- γ yang diinduksi IL-12 karena TGF- β bersifat antagonis terhadap IL-12 (Hunter *et al.*, 1997).

Kajian lain menunjukkan bahwa peningkatan kepekaan dari mencit yang bunting berhubungan dengan penurunan produksi IFN- γ serum (Shirahata *et al.*, 1992). Selain terjadi penurunan dalam jumlah, ternyata fungsi IFN- γ juga dihambat. Penghambatan ini diperantarai oleh TGF- β dan TGF- β berpengaruh meniadakan fungsi mikrobisida dari TNF- α dan IFN- γ (Hirch *et al.*, 1994).

Kepekaan induk semang terhadap infeksi pada saat kebuntingan juga dihubungkan dengan penekanan terhadap fungsi sel NK. Kerja sel NK dalam memproduksi IFN- γ yang sangat berguna untuk membunuh organisme patogen dihambat oleh TGF- β (Hunter *et al.*, 1997). Selain kerjanya dihambat, jumlah sel NK selama kebuntingan menurun. Hal ini dibuktikan penemuan Nigro *et al.* (1999) yang menyimpulkan bahwa pada wanita hamil yang menularkan *T. gondii* ke fetus yang dikandungnya mempunyai kadar sel NK sirkulasi darah dalam jumlah rendah.

Respons seluler terhadap protozoa intraseluler lain yang menyebabkan kelainan reproduksi ditunjukkan oleh Mjihdi *et al.* (2002) dan Fried *et al.* (1998). Mjihdi *et al.* (2002) menginfeksi mencit dengan parasit protozoa intraseluler,

Trypanosoma cruzi, menunjukkan bahwa infeksi akut menyebabkan kelainan reproduksi mencit berupa infertilitas atau kehilangan fetus. Kehilangan fetus tersebut dihubungkan dengan invasi parasit ke plasenta dan nekrosis isemik plasenta. Plasenta mengandung banyak sel infiltran dan menunjukkan nekrosis isemik, terdapat penimbunan fibrin dan trombus vaskuler. Menurut Fried *et al.* (1998), infeksi *Plasmodium falcifarum* meningkatkan kadar TNF- α , IFN- γ dan IL-2 pada plasenta dan perubahan ini berhubungan dengan hasil kebuntingan yang jelek berupa kehilangan fetus dan berat bayi lahir kecil. *Plasmodium* adalah protozoa intraseluler satu ordo dengan *Toxoplasma*.

2.1.7 Infeksi *T. gondii* dan perubahan patologis plasenta

T. gondii mampu menginfeksi tempat *immune privilege*, termasuk retina, Susunan Syaraf Pusat (SSP), dan plasenta. Pada jaringan tersebut, tingkat inflamasi jaringan sering tidak sebanding dengan keberadaan parasit dan perubahan patologis lebih diakibatkan oleh reaksi imun seluler untuk mengontrol infeksi (rev. Mordue *et al.*, 2001). Gambaran mikroskopis plasenta dan jaringan fetus pada kasus abortus domba karena infeksi *T. gondii* yaitu plasentitis nekrotik, plasenta mengalami edematous difus dan berisi leukosit mononuklear dan leukosit bersegmen (Weissmann, 2003). Buxton dan Finlayson (1986) menginfeksi domba dengan *T. gondii* pada umur kebuntingan 60 dan 90 hari (masa kebuntingan domba 150 hari), 10 hari setelah infeksi karunkula menunjukkan kerusakan fokal dan 15 hari setelah infeksi terjadi perubahan degeneratif dari trofoblas. Gambaran yang sama juga ditunjukkan pada hasil nekropsis domba yang mengalami abortus, pada kotiledon terjadi foki nekrotik, sedangkan kambing terinfeksi *T. gondii* foki

nekrotik pada kotiledon hanya kecil dan sebagian besar terlihat normal (Haskell, 2001). Nekrosis plasenta juga terlihat pada plasenta babi yang diinfeksi *T. gondii* pada umur kebuntingan 60 hari dan 42 hari (Dubey *et al*, 1990). Gambaran berbeda ditunjukkan oleh Ferro *et al*. (2002), bahwa plasenta rodensia *C. callosus* yang terinfeksi *T. gondii* terlihat normal. Penelitian terbaru menunjukkan bahwa pada mencit yang terinfeksi *T. gondii*, terjadi peningkatan apoptosis sel desidua dan sel trofoblas (Sardjono, 2005).

2.1.8 Diagnosa toxoplasmosis

Penentuan diagnosis toxoplasmosis sulit dilakukan. Pemeriksaan serologis merupakan cara yang paling sering digunakan. Pada manusia, umumnya diagnosa toxoplasmosis akut didasarkan pada deteksi antibodi dan jarang yang didasarkan pada diketemukannya parasit di cairan, jaringan dan sekresi tubuh. Keberadaan kadar tinggi dari IgG spesifik terhadap *Toxoplasma* menunjukkan bahwa infeksi telah terjadi dan tidak dapat membedakan antara infeksi perolehan yang terjadi saat ini atau infeksi sudah lewat. Titer antibodi IgM spesifik terhadap *Toxoplasma* yang tinggi dan titer IgG yang tinggi menunjukkan infeksi telah terjadi akut 3 bulan sebelumnya, titer IgM rendah sampai sedang dan IgG tinggi menunjukkan infeksi akut telah berjalan 3-6 bulan sebelumnya dan IgM masih terdeteksi sampai 18 bulan setelah terinfeksi (Wilson, 1999 dalam Hughes, 2000). Penentuan waktu kejadian infeksi pada wanita hamil sangat diperlukan karena infeksi pada saat sebelum terjadi konsepsi tidak menimbulkan resiko penularan pada fetus dan hanya infeksi setelah konsepsi yang menimbulkan resiko (Hughes, 2000).

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

Dengan pemeriksaan serologis dapat pula dideteksi keberadaan antigen dalam serum. Hal ini telah dibuktikan oleh Araujo *et al.* (1980), yang menggunakan antibodi monoklonal spesifik untuk mendiagnosa toxoplasmosis dari serum dan cairan tubuh penderita. Antibodi monoklonal merupakan pelacak yang kuat untuk mengidentifikasi immunodominan spesifik pada agen penyakit infeksi serta dapat dipergunakan sebagai alat pendeteksi antigen dalam serum. Menurut Fortier *et al.* (1991) spesifitas dan sensitivitas diagnosis toxoplasmosis

dengan menggunakan antibodi monoklonal cukup tinggi, spesifitas 100% dan sensitivitas 97%.

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

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

2.1.9 Pencegahan toxoplasmosis

Pencegahan yang dapat dilakukan hanya dengan menghindari kontak dengan sumber penularan dalam hal ini kotoran kucing dan daging yang terinfeksi. Lingkungan harus bersih sehingga terindar dari kontaminasi ookista yang keluar bersama kotoran kucing. Daging harus dimasak dengan matang, sayuran dan buah harus dicuci bersih sebelum dimakan. Wanita hamil harus menggunakan sarung tangan sewaktu kontak dengan tanah (berkebun) dan menghindari kontak dengan kucing liar. Lokasi peternakan harus dihindarkan dari

kucing liar. Pemerintah dan industri daging harus terus berusaha mengurangi kemungkinan keberadaan *Toxoplasma* dalam daging. (Hughes, 2000; Weissmann, 2003)

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

Usaha untuk memproduksi vaksin baik untuk manusia maupun hewan terus diusahakan dan difokuskan untuk merangsang perlindungan imunitas tanpa menimbulkan efek infeksi kronis. Beberapa hasil yang diperoleh dari pengembangan vaksin *Toxoplasma* sampai sekarang dirasa belum memuaskan. Sebagai bahan vaksin, kebanyakan percobaan dilakukan dengan menggunakan protein P30 (SAG1), GRA1, GRA7, dan ROP2, tetapi hasil vaksinasi dengan protein tersebut menunjukkan efisiensi vaksin masih sangat terbatas. Sebagai contoh, vaksinasi dengan SAG1 secara intra nasal hanya menurunkan jumlah penyebaran kista di otak tetapi tidak menghilangkan kista tersebut (Velge-Roussel *et al.*, 2000). Vaksinasi dengan Vaksin DNA GRA1, GRA7, dan ROP2 hanya memberikan perlindungan partial (Vercammen *et al.*, 2000), dan hasil tersebut hanya ditunjukkan pada mencit galur C3H, sedang vaksinasi pada mencit BALB/c dan C57BL/6 tidak memberikan perlindungan.

2.1.10 Pengobatan toxoplasmosis

Bervariasi hasil pengobatan toxoplasmosis pada saat kebuntingan. Hasil *review* Wallon *et al.* (1999) dari hasil berbagai penelitian mulai tahun 1966-1997

yang pernah dipublikasi di berbagai media mengenai pengobatan toxoplasmosis pada wanita hamil menunjukkan bahwa tidak sepenuhnya pengobatan efektif. Dari sembilan (9) subyek yang memenuhi kriteria, lima (5) penelitian membuktikan bahwa obat efektif menurunkan penularan dari ibu ke anak dan empat (4) penelitian memberikan bukti bahwa pengobatan tidak efektif. Dari data tersebut disimpulkan bahwa pengobtan masih perlu dievaluasi.

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

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

2.2 Sitokin

Perkembangan respons imun melibatkan sel limfoid, sel inflamatori dan sel hematopoietik. Interaksi antar sel pada sistem imun diperantarai suatu faktor terlarut yang disebut sitokin. Sitokin adalah suatu protein yang disekresikan oleh sel imun alami ataupun adaptif, sebagai respon terhadap rangsangan mikroba atau antigen lain. Sitokin mengatur respons imun melalui rangsangan atau hambatan

aktivasi, proliferasi, dan atau diferensiasi berbagai sel serta melalui pengaturan sekresi antibodi atau sitokin lain. Pada fase aktivasi respons imun, sitokin merangsang pertumbuhan dan diferensiasi limfosit, dan pada fase efektor imunitas alami dan adaptif sitokin mengaktifkan sel efektor untuk mengeliminasi mikroba dan antigen lain. Meskipun berbagai sel dapat mensekresikan sitokin, tetapi sel utama yang memproduksi sitokin adalah makrofag dan limfosit. Sitokin yang dihasilkan oleh sel fagosit mononuklear disebut **monokin** dan sitokin yang dihasilkan oleh limfosit disebut **limfokin**. Kebanyakan sitokin diproduksi oleh leukosit (makrofag dan limfosit) dan kerja sitokin pada leukosit lain maka juga disebut **interleukin**. Sitokin tidak disimpan sebagai molekul pembentuk sitokin. Sintesis sitokin diawali oleh transkripsi gen sebagai akibat aktivasi seluler. Setelah diproduksi, sitokin segera disekresikan. Beberapa sitokin diproduksi oleh beberapa tipe sel dan tiap sitokin biasanya bekerja pada lebih dari satu tipe sel yang berbeda. Kerja sitokin pada umumnya lokal dan dapat bertindak sebagai autokrin maupun parakrin, tetapi beberapa dapat masuk ke dalam sirkulasi dan bertindak sebagai endokrin (Abbas *et al.*, 2000; Goldby *et al.*, 2000; Oppenheim dan Ruscetti, 2001)

Berdasarkan prinsip kerja biologis, fungsi sitokin diklasifikasikan menjadi tiga kategori. Pertama, sitokin berfungsi sebagai mediator dan regulator imunitas alami. sitokin kelompok ini dihasilkan oleh sel fagosit mononuklear sebagai respons agen infeksi. Sitokin pada kelompok ini antara lain: TNF, IL-1, chemokin, IL-12, IFN- α , IFN- β , IL-10, IL-6, IL-15 dan IL-18. Kedua, sitokin sebagai mediator dan regulator imunitas adaptif. Sitokin pada kategori ini adalah sitokin yang pada umumnya dihasilkan oleh limfosit T sebagai respons

pengenalan antigen. Beberapa fungsi sitokin yang dihasilkan sel T antara lain untuk pengaturan pertumbuhan dan didiferensiasi populasi limfosit, aktivasi respons imun dan aktivasi sel efektor seperti sel fagosit mononuklear, neutrofil dan eosinofil. Contoh sitokin dari kelompok ini antara lain: IL-2, IL-4, IL-5, IFN- γ , TGF- β , IL-13. Ketiga, sitokin sebagai stimulator hematopoiesis. Beberapa sitokin diperlukan untuk hemopoiesis dalam *bone marrow* dan sitokin pada kategori ini biasanya disebut *colony-stimulating factor (CSF)*, diantaranya: IL-7, IL-3, GM-CSF, M-CSF, G-CSF, IL-9 dan IL-11. (Abbas *et al.*, 2000)

Sitokin bekerja pada sel target dan baru dapat menimbulkan efek biologis melalui ikatan dengan reseptor sitokin yang dimiliki sel target. Semua reseptor sitokin berisi satu atau lebih protein transmembran, di bagian ekstraseluler berfungsi untuk mengikat sitokin dan di bagian sitoplasma berfungsi pada inisiasi *signalling pathway*. Reseptor dari satu sitokin dapat dimiliki oleh berbagai sel, sehingga satu sitokin dapat bekerja pada berbagai sel. Reseptor sitokin diklasifikasikan berdasarkan homologi struktural domain ekstraseluler yang mengikat sitokin. (Abbas *et al.*, 2000 ; Goldby *et al.*, 2000)

2.2.1 Interferon Gama (IFN- γ) dan Tumor Necrosis Factor Alfa (TNF- α)

IFN- γ adalah sitokin yang dihasilkan oleh sel T dan sel NK. IFN- γ merupakan sitokin yang mengaktifkan makrofag. Sitokin ini berperan penting pada imunitas alami maupun imunitas seluler. IFN- γ dihasilkan oleh sel Th1, sel NK dan sel T CTL. Masing-masing sel tersebut mensekresikan IFN- γ hanya apabila teraktivasi. Sebagai mediator imunitas alami, IFN- γ dihasilkan oleh sel NK karena rangsangan IL-12. Pada imunitas adaptif, IFN- γ dihasilkan oleh sel T

karena teraktivasi oleh IL-12 dan IL-2. IL-12 diproduksi oleh makrofag atau APC sebagai respons terhadap pengenalan antigen. IL-12 dan IFN- γ merupakan pusat imunitas seluler melawan agen intraseluler. APC juga mampu mengekspresikan MHC I sehingga dikenali oleh sel T CTL. Sel T CTL yang teraktivasi oleh IL-2 mampu memproduksi IFN- γ . Aktivitas IFN- γ sangat luas salah satunya adalah kemampuan mengaktifkan makrofag. Makrofag yang teraktivasi IFN- γ meningkatkan ekspresi molekul MHC, meningkatkan produksi sitokin dan meningkatkan aktivitas mikrobisidal. (Abbas *et al.*, 2000; Goldby *et al.*, 2000)

Tumor necrosis factor- α (TNF- α) merupakan polipeptida dengan berat molekul 17-kDa, TNF- α adalah mediator utama respons inflamasi terhadap agen infeksi. Sitokin ini bertanggung jawab terhadap berbagai komplikasi sistemik dari suatu infeksi. Sumber utama TNF- α adalah sel fagosit mononuklear yang teraktivasi, antara lain makrofag. Sel lain yang memproduksi sitokin ini antara lain: sel NK, sel T dan mastosit. Makrofag atau APC memproduksi TNF- α karena rangsangan infeksi dan IFN- γ yang dihasilkan sel NK dan sel T. TNF- α disintesa sebagai protein membran tipe II. TNF- α membran diekspresikan sebagai homotrimer dan sitokin ini merupakan ligan dari salah satu reseptor TNF (TNFR). Fungsi fisiologis TNF- α merangsang penarikan neutrofil dan monosit ke tempat infeksi serta mengaktifkan sel tersebut untuk menghilangkan agen infeksi. Pada infeksi yang parah, TNF- α diproduksi dalam jumlah banyak sehingga dapat menimbulkan efek patologis; diantaranya: debris, penurunan tekanan darah atau *shock*, trombosis dan kerusakan jaringan. (Abbas *et al.*, 2000; Goldby *et al.*, 2000)

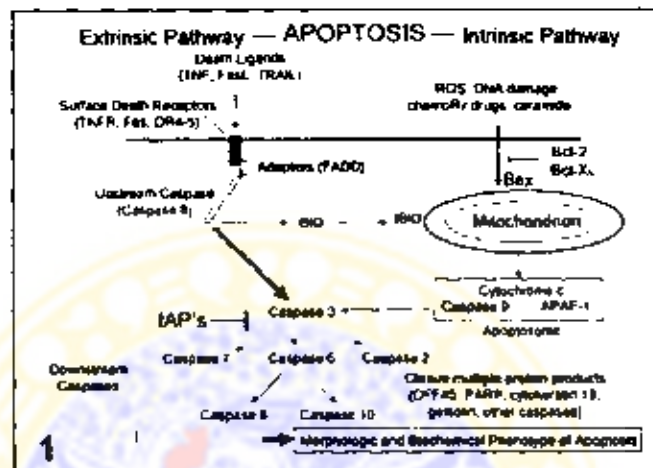
2.3 Apoptosis

Apoptosis adalah suatu proses kematian sel terprogram melalui mekanisme genetik. Tujuan dari program kematian sel untuk menghilangkan sel yang rusak atau tidak diperlukan. Program kematian sel ini memainkan peranan penting pada berbagai proses fisiologis selama perkembangan fetus dan homeostasis pada jaringan dewasa. Dalam sistem imun, apoptosis memainkan peranan penting pada seleksi sel T, penghilangan limfosit B dan T yang reaktif terhadap dirinya sendiri (*self-reactive*), penghilangan sel T efektor mengikuti berakhirnya respons imun, pengaturan memori imunologis dan sitotoksitas sel T CTL dan sel NK terhadap sel target. Apabila sistem pengaturan apoptosis tidak berfungsi akan terjadi berbagai penyakit seperti kanker dan autoimun. (Fesik & Shi, 2001; Gupta, 2003; Reed, 2000)

Secara morfologis, ciri-ciri sel yang mengalami apoptosis antara lain: terjadinya kondensasi kromatin, fragmentasi inti (piknosis), membran plasma menggumpal dan sel mengkerut. Sel terbagi menjadi fragmen kecil-kecil yang dikelilingi dengan membran (badan apoptotik atau *apoptotic bodies*). Badan apoptotik akan dibersihkan dengan cara fagositosis tanpa menimbulkan respons inflamasi. Proses tersebut terjadi sangat cepat yaitu antara 30 sampai 60 menit. (Reed, 2000; Thornberry dan Lazebnik, 1998)

Apoptosis terjadi melalui dua jalur signaling utama, pertama jalur ekstrinsik yaitu apoptosis melalui reseptor kematian (*death receptor*) dan kedua jalur intrinsik yaitu apoptosis melalui mitokondria. Pada kedua jalur, melibatkan berbagai perangkat seluler yang disebut perangkat apoptotik (lihat Gambar 3). Komponen sentral dari perangkat apoptotik ini adalah suatu kelompok protease

sistein yang disebut caspase (*Cysteine Aspartyl-Specific Protease*). Perangkat lain yang terlibat diantaranya: ligan kematian, reseptor kematian, protein adaptor dan protein regulator (baik pro-apoptotik dan anti-apoptotik). (Burrett *et al.*, 2001; Gupta, 2003; Reed, 2000). Berikut adalah gambar skematis jalur apoptosis.



Gambar 3. Diagram Jalur Apoptosis (Burrett *et al.*, 2001)

2.3.1 Apoptosis melalui jalur reseptor kematian

Pada Jalur signaling reseptor kematian, signal diberikan oleh interaksi antara ligan dan reseptor kematian. Terdapat sekitar 8 (dari 17) anggota superfamili TNF yang telah diidentifikasi menunjukkan induksi kematian sel (Phillips *et al.*, 2001), tetapi yang akan dibahas dalam paper ini hanya Fas (CD95) dan TNFR-1. Anggota famili reseptor kematian mempunyai satu sampai lima *cysteine-rich* yang berujung di daerah ekstraseluler dan daerah kematian (*death domain/DD*) pada ekor sitoplasmik. DD sangat diperlukan untuk mengawali signal apoptosis. Setelah terjadi pengikatan reseptor kematian oleh ligan, reseptor kematian mengoligomerisasi dan menarik molekul adaptor dan caspase inisiator

membentuk suatu kompleks yang disebut *death-inducing signaling complex* (DISC). Terbentuknya kompleks tersebut mengaktifkan caspase inisiator. Caspase inisiator yang teraktivasi selanjutnya memecah caspase efektor atau eksekutor (caspase-3, -6, dan -7) dan mengaktifkan caspase efektor. Caspase efektor yang teraktivasi memecah sejumlah substrat target diantaranya: *Poly (ADP-ribose) polymerase* (PARP) dan *DNA fragmentation factor* (DFF) sehingga menyebabkan fragmentasi DNA inti sel dan mengakibatkan apoptosis (Burrett *et al.*, 2001; Gupta, 2003, Sharif-Askari *et al.*, 2001).

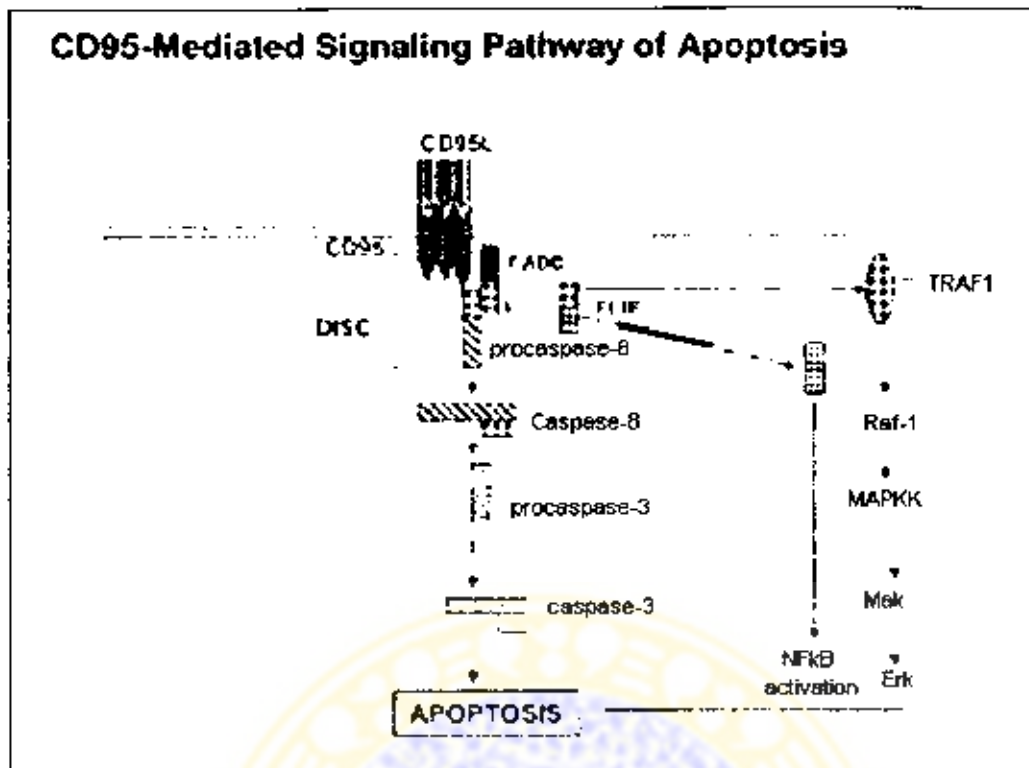
Pada respons imun seluler, kematian sel terjadi karena diinduksi suatu aktivasi (*activation-induced cell death/ AICD*) Kejadian AICD terutama diperantarai oleh interaksi antara Fas (CD95) dengan Fas ligand (CD95L). Molekul lain yang juga terlibat pada proses tersebut adalah interaksi antara TNF dengan TNFR (Gupta, 2003).

2.3.1.1 Apoptosis melalui jalur Fas- Fas Ligan (CD95/CD95L)

Fas (CD95) adalah anggota famili reseptor TNF (TNFR) yaitu suatu glikoprotein dengan berat molekul 45-52 kDa. CD95 merupakan reseptor transmembran tipe I yang secara luas terekspresi dan ada pada limfosit sedangkan Fas ligan atau CD95 ligan (CD95L), adalah protein transmembran tipe II, terekspresi sangat terbatas. Pada limfosit yang tidak aktif, CD95L tidak terekspresi dan baru terekspresi selama aktivasi limfosit. Jalur signaling yang diperantarai Fas (CD95) dapat dilihat pada gambar 4. Pada waktu terikat oleh CD95L atau antibodi monoklonal anti-CD95, CD95 tertrimerisasi dan ikatan tersebut menarik adaptor protein *fas-associated death domain* (FADD), melalui

DD dari CD95 dan DD dari FADD. FADD juga mempunyai *death effector domain* (DED) dan melalui DED ini FADD menarik dan berinteraksi dengan procaspase-8 (Flice) membentuk suatu DISC. Procaspase-8 yang terikat oleh FADD teraktivasi menjadi caspase-8 yang aktif. Caspase 8 dapat memecah sejumlah procaspase efektor seperti procaspase-3 menjadi caspase efektor yang aktif sehingga mampu memecah dan mengaktivasi sejumlah substrat DFF dan PARP sehingga menyebabkan fragmaentasi DNA inti sel dan terjadi apoptosis. (Abbas *et al.*, 2000; Ashkenazi dan Dixit, 1998; Burrett *et al.*, 2001; Gupta, 2003; Reed, 2000; Sharif-Askari *et al.*, 2001; Wolf dan Green, 1999)

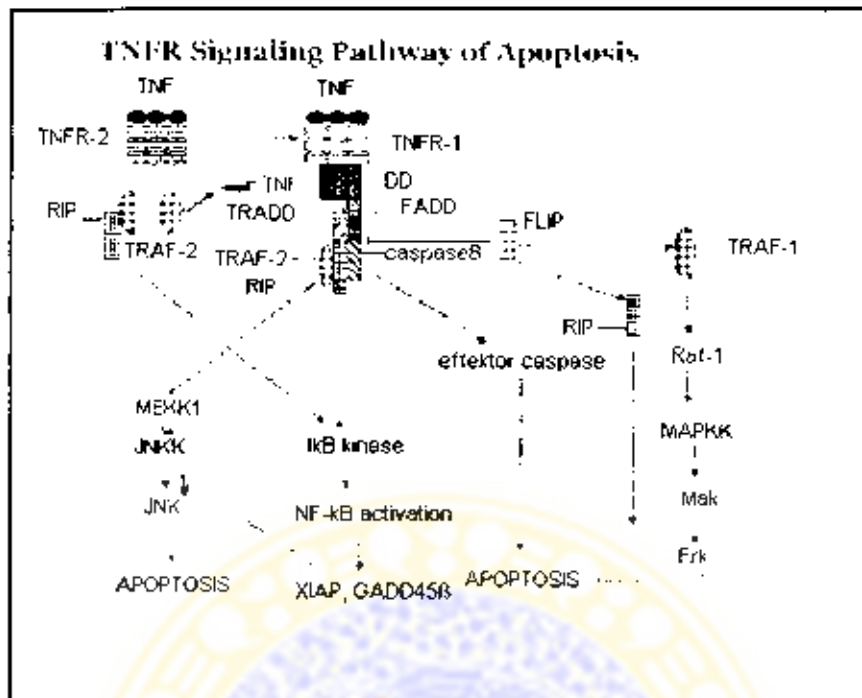
Apoptosis yang diperantarai interaksi CD95-CD95L diregulasi oleh molekul lain yang memiliki DED, yaitu FLIP (*Flice-inhibitory protein*). FLIP seluler (*Cellular FLIP/cFLIP*) berbentuk FLIP1 (*long*) dan FLIPs (*short*). FLIP1 mempunyai dua DED dan dapat berikatan dengan caspase-8 dan -10, tetapi FLIP1 tidak mempunyai aktivitas protease. Ekspresi yang berlebih dari FLIP1 atau FLIPs mengakibatkan resistensi terhadap apoptosis yang diperantarai Fas. FLIP juga mengaktifkan NF- κ B dan jalur *signaling* Erk melalui penarikan protein adapter (termasuk RIP, TRAF-1,2,3). DED dari FLIPs mengikat kompleks CD95-FADD dan menghambat penarikan dan aktivasi caspase-8 dan bahkan bertindak sebagai molekul anti-apoptotik. Karena FADD juga digunakan sebagai molekul adaptor untuk apoptosis yang diinduksi TNF, FLIP juga merupakan molekul anti-apoptotik pada apoptosis yang diperantarai baik CD95 maupun TNFR-1.



Gambar 4. Apoptosis yang diperantarai oleh Fas. (Gupta, 2003)

2.3.1.2 Apoptosis melalui jalur TNF-TNFR.

Sitokin TNF- α menjalankan aktivitas biologisnya melalui ikatan dengan reseptor tipe 1 dan 2 (TNFR-1 dan TNFR-2) dan pengaktifan beberapa jalur signaling. TNFR-1 mempunyai DD sedangkan TNFR-2 tidak mempunyai DD. TNFR-1 memberi signal kematian sel dan sel tahan hidup (*survival cell*) sedangkan TNFR-2 utamanya memperantarai *signaling* untuk sel yang tetap hidup, tetapi data terbaru menunjukkan bahwa TNFR-2 meningkatkan kemampuan signaling kematian yang diperantarai oleh TNFR-1. *Signaling* yang diperantarai oleh TNF baik untuk kematian sel maupun sel tahan hidup memerlukan molekul adaptor dan signaling ikutan (*downstream*) lainnya yang berbeda. (Gupta, 2003; Phillips *et al.*, 2001). Tahapan *signaling* yang diinduksi TNF- α dapat dilihat pada gambar 5.



Gambar 5. Apoptosis yang diperantarai oleh TNFR (Gupta, 2003).

Interaksi TNF- α dengan TNFR-1 menyebabkan trimerisasi DD dari TNFR-1. TNFR-1 menarik protein adaptor, *TNFR-associated death domain* (TRADD). TRADD akan menarik protein adaptor yang lain FADD. FADD menarik procaspase-8 melalui interaksi protein DED dan membentuk DISC. Selama DISC terbentuk procaspase-8 teraktivasi menjadi caspase-8. Caspase-8 yang aktif secara cepat lepas dari DISC masuk dalam sitoplasma dan bertindak sebagai enzim untuk caspase efektor, caspase-3, -6, dan -7. Caspase efektor, utamanya caspase-3 memecah sejumlah substrat DFF dan PARP sehingga terjadi fragmentasi DNA dan apoptosis. (Abbas *et al.*, 2000; Burrett *et al.*, 2001; Dumur *et al.*, 2001; Goldsby, 2000; Gupta, 2003; Sharif-Askari *et al.*, 2001)

Apoptosis yang diperantarai oleh FADD diregulasi oleh FLIP (*Flice-inhibitory protein*) yang dapat menghambat caspase inisiator. FLIP adalah suatu anggota famili protein virus vFLIP, dan sekerabat (berhubungan) dengan protein seluler cFLIP, mempunyai DED yang sama untuk berhubungan dengan segmen FADD dan procaspase-8, yang tidak mempunyai bagian yang berfungsi proteolitik. FLIP juga menghambat sinyal kematian oleh TNFR-1 melalui interaksi DED dari FADD. FLIP terekspresi pada sel mamalia sebagai dua sambungan (*splice*), FLIPs dan FLIP_L. Laporan terbaru menunjukkan bahwa FLIP menghambat apoptosis melalui dua mekanisme yang berbeda, pertama melalui penghambatan interaksi antar FADD dan procaspase-8 dan kedua melalui aktivasi signal tahan hidup (*survival signal*). Mekanisme *switching* penarikan RIP, TRAF-1 dan TRAF-2 yang diperantarai oleh FLIP sehingga mengaktifkan Erk dan NF- κ B belum jelas. (Gupta, 2003)

2.4 Desidua dan Trofoblas

Plasenta adalah organ vital yang tidak dapat hidup tanpa embrio di dalam uterus. Fungsi plasenta untuk pertukaran udara, nutrisi dan sisa-sisa antara maternal dan fetal. Plasenta menghasilkan hormon dan faktor pertumbuhan dan bertanggung jawab pada perlindungan imun fetus. Beberapa keadaan lingkungan local dari plasenta mempengaruhi perkembangan plasenta yang mengakibatkan penghambatan pertumbuhan fetus dan kematian fetus. Lingkungan yang dimaksud di sini adalah berbagai sel dan faktor terlarut seperti sitokin dan faktor pertumbuhan.

Plasenta berasal dari dua komponen yaitu maternal dan fetal. Komponen maternal disebut **desidua** dan komponen fetal adalah **Trofoblas**.

Jaringan desidua terbentuk setelah terjadi implantasi. Sel stroma uterus berproliferasi dan berdiferensiasi membentuk desidua, menyebabkan dinding uterus lebih tebal lima kali lipat uterus normal dan banyak mengandung glikogen dan lipid. Perkembangan dan pemeliharaan desidua dipengaruhi oleh hormon progesteron. Di desidua terbentuk pembuluh darah baru yang memungkinkan darah maternal mencapai tempat implantasi. Desidua memiliki beberapa fungsi yang penting untuk mempertahankan kehamilan, meliputi: 1) imunomodulasi; 2) nutrisi; 3) endokrin; 4) regulasi invasi trofoblas. (Rossant dan Cross, 2001; Soares, 2005)

Trofoblas adalah sel yang berasal dari lapisan sel luar (*tropectoderm*) dari blastosit yang memperantarai proses implantasi dan plasentasi. Keberhasilan implantasi tergantung pada interaksi antara blastosit dan endometrium. Pada manusia, agar implantasi terjadi, trofoblas harus menempel pada epitel permukaan endometrial. Trofoblas kemudian menerobos di antara sel endometrial, masuk ke besemen membran dan menginvasi ke arteri spiralis maternal (Aplin dan Kimber, 2004). Trofoblas berkembang dan berdiferensiasi berdasarkan fungsinya, menjadi 1) villi sinsitiotrofoblas yang secara aktif memproduksi hormon, 2) *extravillous anchoring trophoblastic cell columns*, dan 3) trofoblas yang invasif. Trofoblas yang tidak berdiferensiasi disebut sitotrofoblas. Sitotrofoblas merupakan precursor semua trofoblas yang lain. Sitotrofoblas pada plasenta manusia sebagai sel mononuklear. (Kliman, 2005)

Pada menciit, sekitar waktu implantasi, terjadi pembentukan tipe sel trofoblas yang berbeda. Sel trofektoderm yang dekat dengan *inner mass cell* (ICM) berproliferasi dan berkembang menjadi *extra-embryonic ectoderm* dan *ectoplacental cone* segera setelah terjadi implantasi konseptus. Sel trofektoderm yang jauh dari ICM berhenti membelah, tetapi pembelahan inti berlanjut membentuk sel Giant trofoblas (*trophoblast Giant Cell*). Trofoblas menciit terdiferensiasi menjadi empat fenotipe trofoblas yaitu: 1) sel Giant 2) sel spongiotrofoblas, 3) sel glikogen; 4) sel trofoblas sinsitial. Sel Giant terbentuk karena proses *endoreduplication* (sintesis DNA tanpa terjadi pembelahan sel). Sel Giant bersifat invasif dan mempunyai aktivitas memproduksi hormon. Sel spongiotrofoblas, secara morfologis berbeda dengan sel Giant, tetapi juga berfungsi menghasilkan endokrin. Spongiotrofoblas adalah lapisan yang berbentuk kompak dari sel trofoblas non-sinsitial, terletak antara labyrinth dan sel Giant. Trofoblas, dengan pembuluh darah fetal, berkembang secara ekstensif membentuk percabangan villous membentuk struktur yang disebut labyrinth Trofoblas di labyrinth disebut trofoblas labyrinthine. Sel glikogen mengandung glikogen dan merupakan sumber energi. Sel sinsitial adalah sel dengan banyak inti yang merupakan fusi dari sel progenitor trofoblas dan bertanggungjawab sebagai transpot nutrisi dan sisa makanan. (Rossant dan Cross, 2001)

2.5 Respons Imun terhadap Kebuntingan

Selama kebuntingan, di dalam tubuh maternal, fetus kontak secara langsung dengan darah maternal. Meskipun fetus mempunyai antigen asing yang berasal dari paternal, tetapi fetus tidak ditolak oleh respons imun maternal.

Hubungan antara maternal dan fetus memerlukan kerja imunomodulator yang khusus, karena fetus harus dilindungi dari penolakan respons imun maternal. Sementara, pada saat yang bersamaan, sistem imun maternal harus melindungi dari serangan agen infeksi baik untuk melindungi maternal maupun maupun fetus. Misteri ini sering disebut dengan *immunological paradox of pregnancy* (Arvola, 2001). Para peneliti terus mencari penjelasan imunologis kenapa kebuntingan dapat dipertahankan. Hasil penelitian para peneliti menunjukkan bahwa plasenta merupakan organ yang berperanan terhadap daya tahan fetus dari penolakan maternal, tetapi mekanisme fetus dapat menghindari dari pengenalan dan penolakan maternal sampai saat ini masih belum pasti (Arvola, 2001).

Respons imun maternal selama kebuntingan kecenderungan ke arah respons imun humoral dan sebaliknya respons seluler ditekan. Sel maternal yang dirangsang oleh jaringan fetoplasental cenderung memberi respons sitokin tipe Th2 yang menguntungkan kebuntingan dan menurunkan pengaturan sitokin Th1 yang bersifat merusak kebuntingan. (Wegmann *et al.*, 1993)

Keberhasilan kebuntingan tergantung pada toleransi sistem imun maternal terhadap fetus dan apabila toleransi tidak tercapai akan terjadi kegagalan kebuntingan. Toleransi tersebut dapat tercapai melalui tiga mekanisme. Pertama, trofoblas mengekspresikan molekul tertentu. Kedua, karena pengaruh sitokin tertentu pada *maternal-fetal interface* dan ketiga, plasenta memproduksi agen immunosupresif. (Abbas *et al.*, 2000; Coulam, 2000; Viganò dan Ranieri, 2000)

Trofoblas tidak mengekspresikan MHC klasik, sehingga tidak dapat dikenali dan dilisiskan sel imun maternal. Pada manusia, trofoblas mengekspresikan MHC Kelas I nonklasik, yaitu MHC I β dan disebut HLA-G.

Fungsi molekul HLA-G untuk melindungi sel trofoblas dari lisis yang diperantarai sel NK maternal. Trofoblas juga mengekspresikan Fas Ligan (FasL). FasL ini merupakan mekanisme pertahanan melawan leukosit maternal. Di *maternal-fetal interface* terjadi apoptosis leukosit maternal karena peranan FasL. Untuk menghindari sel T melisis trofoblas, melalui metabolisme triptofan, trofoblas mengekspresikan enzim indolamine 2,3-deoxygenase, yaitu enzim katabolisme triptofan. Kerja enzim indolamine 2,3-deoxygenase menekan fungsi sel T. Plasenta juga memproduksi prostaglandin (PGE_2) dan progesteron yang berpengaruh pada perubahan respons ke arah ke Th2. (Abbas *et al.*, 2000; Coulam, 2000; Kauma *et al.*, 1999; Miyaura dan Iwata, 2002)

Toleransi juga tergantung pada interaksi antara sekresi sitokin maternal dengan sel fetus. Komunikasi antara sel trofoblas (fetus) dengan sel desidua (maternal) diperantarai oleh sitokin dan reseptor permukaan sel. Sitokin diproduksi oleh sel imun di desidua dan trofoblas. Sel imun yang berada pada desidua meliputi sel T CD8^+ , makrofag, sel NK (CD56^+) dan CD4^+ . Sebagai akibat dari komunikasi intraseluler antara trofoblas dan desidua terjadi perubahan ekspresi sitokin baik tipe maupun kuantitas sitokin. Sitokin yang mengalami perubahan ekspresi meliputi CSF, $\text{TNF-}\alpha$, $\text{IFN-}\gamma$, $\text{TGF-}\beta$, dan beberapa interleukins. (Coulam, 2000; Vigano dan Ranieri, 2000; Vince dan Johnson, 2000)

Keseimbangan sitokin Th1 dan Th2 sangat menentukan keberhasilan kebuntingan. Pola dominasi sitokin Th2 di plasenta melindungi fetoplental dari penolakan oleh imunitas adaptif yang diperantarai sel, inflamasi alami non spesifik dan respons fagosit. $\text{IFN-}\gamma$ dan $\text{TNF-}\alpha$ bersifat embriotoksik. $\text{TNF-}\alpha$ dapat menyebabkan nekrosis embrio implantan sedangkan $\text{IFN-}\gamma$ menghambat sekresi

CSF-1. CSF-1 berfungsi mendorong pertumbuhan dan diferensiasi blastosit. Interleukin- β dan TNF- α berperan sebagai regulator apoptosis trofoblas, produksi protease, angiogenesis dan biosintesis dari sitokin trofoblas, prostaglandin dan hormon. Interleukin IL-2 mempunyai kemampuan mengaktivasi sel NK. Sel NK desidua yang teraktivasi IL-2 mampu melisis sel trofoblas. Sitokin Th2, seperti IL-4, IL-10 dan TGF- β berperan pada perlindungan embrio dari penolakan maternal. Interleukin-4 bersifat antagonis terhadap IL-12. IL-4 menginduksi diferensiasi Th0 ke arah Th2 sedangkan IL-12 menginduksi ke arah Th1. Interleukin-4 juga menghambat prostaglandin dan produksi sitokin dari monosit, *switching* Ig G dari sel B, merangsang diferensiasi sel eritroid dan pertumbuhan sel B, meregulasi aktivasi monosit dan sitotoksitas sel T. Ciri kerja IL-4 untuk pemeliharaan imunitas humoral dan dominasi Th2, untuk mempertahankan kebuntingan. Interleukin-10 diproduksi oleh sitotrofoblas mempunyai peranan utama untuk diferensiasi Th0 menjadi Th2. Interleukin-10 pada awal kebuntingan diperlukan untuk pertumbuhan dan perkembangan fetus serta plasenta. Kerja IL-10 juga menghambat pengaruh produksi prostaglandin dan sitokin yang dihasilkan oleh makrofag dan monosit. Sitokin TGF- β dihasilkan oleh sel desidua. Fungsi TGF- β menghambat aktifitas makrofag dan menghambat produksi sitokin monosit. TGF- β merupakan sitokin yang mempunyai banyak fungsi yang diperlukan untuk perkembangan embrio dan penting sebagai regulator fungsi trofoblas. Pengaruh yang besar dari TGF- β terhadap regulasi perkembangan embrio terjadi pada awal kebuntingan. Jadi Respons inflamasi yang ditandai dengan produksi sitokin pro-inflamatori (Th1) diperlukan pada awal implantasi, yaitu diperlukan untuk invasi trofoblas dan angiogenesis. Segera

setelah terjadi implantasi, respons harus segera berganti dari Th1 ke Th2. (Coulam, 2000; Hanna *et al.*, 2000; Smith *et al.*, 2001; Viganò dan Ranieri, 2000; Zhang *et al.*, 2001)

Perubahan keseimbangan antara sitokin Th1 ke Th2 diperantarai hormon kebuntingan dan sitokin TGF- β (Coulam, 2000). Pada kebuntingan normal, ratio sitokin Th1/Th2 tertinggi pada kebuntingan trimester pertama dan menurun pada trimester kedua dan trimester ketiga (Shimaoka *et al.*, 2000). Kemungkinan tersebut dapat terjadi karena populasi limfosit desidua pada kebuntingan awal didominasi oleh subset sel Th1 dan dominasi subset Th2 baru terjadi pada umur kebuntingan lanjut (Arck *et al.*, 1999). Pendapat tersebut didukung oleh Ashkar *et al.* (2000) yang mengatakan bahwa limfosit yang dominan di tempat implantasi adalah sel NK dan sel NK adalah sumber IFN- γ yang diperlukan untuk vaskularisasi di desidua. Dominasi sel NK di tempat implantasi bersifat sementara, populasi mulai menurun setelah umur kebuntingan menciit 12 hari.

Alasan lain kenapa fetus tidak ditolak oleh maternal kemungkinan karena plasenta (desidua) merupakan *immunologically privileged site*, yaitu suatu tempat di jaringan tubuh yang tidak terjangkau respons imun atau terjadi penghambatan respons imun. Jaringan lain yang termasuk *immunologically privileged site*, yaitu: otak, mata dan testis. Respons imun di tempat *immune privilege* terjadi tidak seperti respons imun secara umum. Banyak faktor yang terlibat pada *immune privilege*. (Abbas *et al.*, 2000)

2.6 Pengaruh Hormon Kebuntingan pada Sistem Imun

Plasenta mensekresikan hormon steroid, estrogen dan progesteron dalam jumlah yang banyak. Kadar hormon tersebut meningkat secara tajam selama kebuntingan. Pada awal kebuntingan, progesteron diproduksi oleh corpus luteum, tetapi pada kebuntingan lanjut produksi progesteron didominasi oleh plasenta. Sejalan dengan umur kebuntingan produksi progesteron meningkat secara bertahap sampai masa akhir kebuntingan. Konsekuensi dari peningkatan ini membawa pengaruh besar terhadap sistem imun maternal, baik respons imun adaptif maupun alami. Kedua hormon tersebut menekan sel imun seperti sel NK dan sel T. Estrogen menekan aktivitas sitolitik sel NK. Progesteron menekan aktivitas sitolitik NK, aktivitas sitolitik limfosit T dan menghambat proliferasi limfosit T, menghambat perkembangan sel Th1 dan meningkatkan perkembangan sel Th2 sehingga keseimbangan Th1/Th2 berubah ke arah Th2. Perubahan tersebut terjadi karena pengaruh hormon estrogen dan progesteron menurunkan ekspresi T-bet. T-bet adalah suatu protein faktor transkripsi yang berpengaruh langsung terhadap diferensiasi Th0 menjadi Th1. (Dosiou dan Giudice, 2005; Kawana *et al.*, 2005; Roberts *et al.*, 2001; Spencer, 2004)

Progesteron berperan mempertahankan kebuntingan melalui pengaturan produksi sitokin. Progesteron mendorong ekspresi sitokin IL-4 dan IL-5. Di bawah pengaruh progesteron, limfosit wanita hamil menghasilkan protein PIBF (*progesteron-induced blocking factor*). PIBF menginduksi produksi sitokin tipe 2. Progesteron terlibat pada perubahan pola produksi sitokin pada wanita hamil. Terdapat peningkatan IL-12 dan penurunan PIBF serta IL-10 pada pasien dengan resiko prematur dibanding dengan wanita hamil normal. PIBF meningkatkan

produksi IL-10 dan memblokir produksi IL-12. (Beckerman dan Dudley, 2001) Piccinni *et al.*, 1995, 2000 dan 2001)

Selain berpengaruh pada subset sel T, progesteron juga berpengaruh terhadap aktivitas sel NK. Progesteron menyebabkan penurunan jumlah, aktivitas dan toksisitas sel NK baik secara langsung bekerja pada sel NK dan/atau melalui respons sitokin Th2 dan produksi PIBF. Protein PIBF memodulasi aktivitas sel NK, dengan cara menurunkan aktivitas sitotoksik sel NK dan mekanisme penekanan aktivitas terlihat melalui penghambatan degranulasi sel NK (Dosiou dan Giudice, 2005; Roberts *et al.*, 2001).

Pengaruh hormon kebuntingan tersebut tidak terbatas pada sistem imun jaringan reproduksi saja tetapi melibatkan sistem imun sistemik, karena hormon masuk dalam sirkulasi maternal-plasental dan menyebabkan peningkatan yang tajam kadar hormon dalam plasma maternal. Hormon tersebut mempengaruhi fungsi dari semua tipe sel imun, termasuk berbagai sel dari sistem imun alami, seperti mastosit, eosinofil, makrofag, sel dendrit dan sel NK. Semua sel tersebut selain sebagai pertahanan melawan berbagai organisme patogen juga memainkan peranan penting pada perkembangan langsung respons imun adaptif. Progesteron bersifat immunosupresif sehingga individu bunting lebih peka terhadap patogen. (Beckerman dan Dudley, Robert *et al.*, 2001)

2.7 Apoptosis Trofoblas, Sitokin di Plasenta dan Kegagalan Kebuntingan

Apoptosis trofoblas merupakan kejadian normal pada plasenta. Pada kebuntingan normal, peningkatan apoptosis trofoblas terjadi sejalan dengan umur kebuntingan. Selama implantasi, apoptosis penting untuk *remodeling* jaringan

desidua maternal dan invasi trofoblas. Kejadian apoptosis trofoblas lebih tinggi pada kebuntingan trimester ketiga dibanding dengan trimester pertama, hal ini menunjukkan bahwa peningkatan apoptosis trofoblas terlibat pada proses kelahiran. Trofoblas pada trimester pertama lebih tahan terhadap apoptosis yang diperantarai Fas, namun demikian apoptosis trofoblas juga terjadi pada trimester pertama. Hal ini menunjukkan bahwa jumlah sel yang konstan pada tempat implantasi sangat diperlukan untuk pertumbuhan dan perkembangan plasenta. (Mor dan Abrahams, 2003; Smith *et al.*, 1997b)

Meskipun apoptosis trofoblas merupakan kejadian fisiologis normal pada plasenta, tetapi peningkatan apoptosis plasenta merupakan keadaan patologis dan merupakan ciri dari penolakan trofoblas sehingga dapat menyebabkan komplikasi kebuntingan, berupa abortus, lahir mati dan berat lahir ringan. Keadaan yang sering dihubungkan dengan peningkatan apoptosis trofoblas antara lain *intrauterine growth restriction* (IUGR), preeclampsia dan Chorioamnionitis. (Allaire *et al.*, 2000; Aschkenazi *et al.*, 2002; Balkundi *et al.*, 2003; Crocker *et al.*, 2003; Smith *et al.*, 1997c; Smith *et al.*, 2001)

Menurut Olivares *et al.* (2002) aktivasi limfosit desidua menginduksi apoptosis trofoblas dan limfosit desidua teraktivasi menyebabkan abortus. Apoptosis trofoblas dapat dipicu oleh berbagai rangsangan yang terlibat pada *signaling cascade* (Dumur *et al.*, 2001), di antaranya diperantarai oleh sitokin Th1 atau sitokin proinflamator.

Lingkungan lokal dari *maternal-fetal interface* adalah berbagai tipe sel dan faktor terlarut yang dihasilkan sel di lingkungan tersebut. Produksi dan pengaruh sitokin pada tempat implantasi penting untuk pengaturan pertumbuhan,

diferensiasi dan invasi trofoblas. Pada kebuntingan normal, khususnya di *maternal fetal interface*, sitokin Th2 (anti-inflamatori), merupakan sitokin dominan. Keseimbangan yang tepat antara sitokin Th1 dan Th2 diperkirakan sebagai penentu keberhasilan kebuntingan. Pada kebuntingan normal, produksi sitokin Th1 (seperti IL-2, TNF- α dan IFN- γ) ditekan, sedangkan sitokin Th2 (seperti IL-4, IL-6 dan IL-10) ditingkatkan. Aktivitas tersebut dipicu oleh pengaruh hormon kebuntingan, terutama estrogen dan progesteron. Trofoblas dan desidua secara normal mengekspresikan kedua sitokin tersebut, tetapi produksi sitokin Th1 yang berlebihan terutama TNF- α atau IFN- γ membahayakan kebuntingan menyebabkan kelahiran dini. (Mor dan Abrahams, 2003; Piccinni *et al.*, 2001; Roberts *et al.*, 2001)

Sel imun, terutama makrofag, sel T dan sel NK, merupakan sumber sitokin dan faktor pertumbuhan serta bertanggungjawab pada pemeliharaan keseimbangan sitokin Th1 dan TH2 di plasenta. Populasi leukosit pada desidua didominasi oleh makrofag, LGL dan sel T CTL (sel T CD8+) sedangkan sel T CD4+ (T helper/Th) hanya sebagian kecil (Vince dan Johnson, 2000). LGL adalah leukosit yang secara morfologis dan fenotifikal sama dengan sel NK darah perifer. Sel ini mengekspresikan CD56 tetapi kehilangan CD16 dan mempunyai kemampuan sitotoksik seperti NK sel. Jadi LGL termasuk keturunan dari sel NK. Aktivitas sitotoksik dari sel tersebut akan terekspresi apabila teraktivasi oleh IL-2. Pada uteroplasental tidak diproduksi IL-2, ketidakberadaan IL-2 merupakan salah satu mekanisme pengaturan lokal untuk mempertahankan fetus (Viganò dan Ranieri, 2000). Pada kondisi patologis seperti proses infeksi, IL-2 diproduksi dan produksi IL-2 pada keadaan infeksi menyebabkan abortus. Hal ini dibuktikan oleh

Jordan *et al.* (2001) yang mengatakan bahwa produksi IL-2 akibat infeksi Human Parvovirus B19 pada wanita hamil menjadi penyebab abortus.

Pada suatu percobaan, pemberian IL-2 pada mencit bunting menyebabkan abortus. Hal ini karena terjadi peningkatan apoptosis plasenta terutama sel trofoblas di bagian villous akibat aktivasi sel T CTL maternal (Shiraishi *et al.*, 1996). Interleukin-2 berfungsi mengaktifkan sel NK dan CTL (sel T CD8+). Sel NK dan CTL yang teraktivasi IL-2 berkemampuan melisis sel target melalui produksi perforin dan granzim. Perforin berfungsi membuat saluran masuk granzim ke sel target dan granzim mengaktifkan caspase apoptotik (Goldsby *et al.*, 2000).

Sel T CTL dan sel NK yang teraktivasi IL-2 juga mampu mengekspresikan Fas Ligan (Goldsby *et al.*, 2000) yang dapat membunuh sel target yang memiliki Fas. Pada keadaan normal, trofoblas mengekspresikan Fas dalam kadar yang sangat rendah dan tahan terhadap apoptosis yang diperantarai Fas, tetapi keberadaan IFN- γ dan TNF- α memicu peningkatan ekspresi Fas dan kepekaan terhadap apoptosis yang diperantarai Fas (Aschkenazi *et al.*, 2002; Balkundi *et al.*, 2003). Ikatan Fas Ligan sel T CTL dengan Fas yang dimiliki trofoblas mengakibatkan apoptosis trofoblas. Apoptosis plasenta yang diperantarai oleh Fas juga dibuktikan oleh Ejima *et al.* (2000) yang memapar mencit bunting dengan LPS. Dikatakan bahwa induksi LPS, dapat menyebabkan apoptosis plasenta yang diperantarai Fas baik secara mandiri maupun bersama-sama dengan sitokin lain seperti TNF- α , IL-1 α dan IL-8.

Makrofag yang teraktivasi menghasilkan TNF- α . Secara normal, uterus dan plasenta memproduksi TNF- α (Gorivodsky *et al.*, 1998) tetapi ekspresi TNF- α

selama kebuntingan mencit sangat terbatas (Roby dan Hunt, 1994) dan produksi TNF- α yang abnormal dihubungkan dengan kegagalan kebuntingan (Gorivodsky *et al.*, 1998). Kegagalan tersebut berupa: kelahiran dini, abortus atau pertumbuhan embrio terhambat (*embryo growth retardation*). Hal ini karena produksi TNF- α oleh makrofag dapat memicu apoptosis trofoblas (Phillips *et al.*, 2001) melalui ikatan TNF- α dengan reseptor TNF tipe 1 (TNFR1) yang dimiliki oleh trofoblas (Dumur *et al.*, 2001).

2.8 Apoptosis pada Infeksi *T. gondii*

Pada infeksi *T. gondii* apoptosis justru terjadi pada sel yang tidak terinfeksi dan bukan pada sel yang terinfeksi karena *T. gondii* mampu melindungi sel residen dari apoptosis (Mordue *et al.*, 2001). Kemampuan *T. gondii* menghindarkan sel terinfeksi dari apoptosis merupakan usaha parasit untuk mempertahankan hidup, memperluas penyebaran organisme dan membentuk kista (Nash *et al.*, 1998).

Kajian tentang hambatan apoptosis sel yang terinfeksi *T. gondii* melalui berbagai mekanisme kebanyakan dilakukan secara *in vitro*. Kultur yang dipergunakan untuk membuktikan terjadinya hambatan apoptosis antara lain sel *human-derived HL-60* (Goebel, *et al.*, 1999 dan Goebel, *et al.*, 2001), makrofag mencit (Hisaeda *et al.*, 1997). Sel T yang dikultur bersama sel *Human Myeloid Dendritic* (Wei *et al.*, 2002) dan sel T mencit (Nash *et al.*, 1998).

Nash *et al.* (1998) menunjukkan infeksi *T. gondii* menghambat apoptosis yang diinduksi oleh sel T CTL (baik tergantung maupun tidak tergantung pada Fas), radiasi sinar gamma, radiasi sinar ultraviolet, penghambatan *growth factor*,

dan toxin. Mekanisme hambatan apoptosis sel terinfeksi melalui berbagai jalur diantaranya: pelepasan sitokrom c sehingga terjadi penurunan aktivitas caspase cascade (Goebel, *et al.*, 2001), peningkatan ekspresi *heat shock protein 65* (HSP65) oleh sel T- $\gamma\delta$ (Hisaeda *et al.*, 1997) dan aktivasi NF- κ B (Caamano *et al.*, 2000).

Beberapa peneliti juga mengkaji apoptosis beberapa organ yang diakibatkan oleh infeksi *T. gondii* secara *in vivo*. Kajian ini dilakukan melalui hewan coba mencit. Mencit yang diinfeksi secara peroral mengalami apoptosis sel T *Peyer's patch* (Liesenfeld *et al.*, 1996). Dikatakan bahwa apoptosis sel T *Peyer's patch* tergantung Fas dan diinduksi oleh IFN- γ . Apoptosis yang diperantarai oleh ikatan Fas-Fas Ligan juga terjadi pada toxoplasmosis okuler (Hu *et al.*, 1999). Keterlibatan IFN- γ terhadap apoptosis juga dibuktikan oleh Shen *et al.* (2001). Dikatakan bahwa apoptosis pada *central nervous system* (CNS) mencit yang terinfeksi *T. gondii* melibatkan ekspresi IFN- γ , tetapi menurut Gavrilescu dan Denkers (2001) hanya ekspresi IFN- γ yang berlebih yang dapat memicu apoptosis sel limpa dan overproduksi IFN- γ hanya dipicu oleh *T. gondii* galur sangat virulen bukan galur avirulen. Pendapat lain diungkapkan Deckert-Schlüter *et al.* (1998) apoptosis sel imun di intracerebral tergantung pada ekspresi TNFR-1, pendapat ini didukung Mordue *et al.* (2001), dikatakan bahwa apoptosis sel limpa tergantung pada TNFR-1 dan tidak tergantung ekspresi Fas. Mordue *et al.* (2001) juga menambahkan bahwa apoptosis pada hati dan lien mencit yang diinfeksi lebih merupakan konsekuensi sekunder dari patogenesis toxoplasmosis.

2.9 Mencit Sebagai Hewan Coba

Beberapa hewan coba yang telah digunakan sebagai model infeksi *T. gondii* baik pada infeksi perolehan maupun infeksi kongenital. Hewan coba tersebut antara lain: mencit, tikus, marmut (*guinea-pig*), kelinci dan monyet. Mencit merupakan hewan coba yang paling sering digunakan dan terbaik untuk model eksperimental toxoplasmosis kongenital (Flori *et al.*, 2002). Hal tersebut mungkin karena struktur plasenta manusia sama dengan struktur plasenta rodensia (mencit, tikus dan kelinci) dan primata (monyet), yaitu hemochorion (Dupouy-Camet, 2002; Kanellopoulos-Lengevin *et al.*, 2003).

Galur mencit yang pernah digunakan sebagai hewan coba, antara lain: galur BALB/C, C56, C57BL/6 (H-2b), C3H/HeN (H-2k), Swiss, SCID dan Nude (Dupouy-Camet, 2002). Pada umumnya mencit dibuat kekurangan dari materi yang akan dicobakan, antara lain mencit kekurangan IL-4, INF- γ , TNF- α dan lain sebagainya. Di bawah ini akan dipaparkan contoh percobaan yang menggunakan model hewan coba mencit untuk mempelajari toxoplasmosis.

Penelitian yang dilakukan oleh Roberts dan Alexander (1992) dengan mencit BALB/C menunjukkan bahwa penularan terjadi hanya pada mencit yang terinfeksi pertama kali selama kebuntingan. Thouvenin *et al.* (1997), menggunakan mencit BALB/C yang tidak memiliki IL-4 (IL-4^{-/-}) untuk membuktikan peranan IL-4 sebagai immunosupresif pada kebuntingan. Dari hasil penelitian itu disimpulkan bahwa IL-4 dan substansi lain yang berhubungan dengan kebuntingan meningkatkan pasase *T. gondii* secara transplasental.

Selain mencit, rodensia yang pernah dipergunakan untuk infeksi toxoplasmosis yaitu tikus. Pada model eksperimental menggunakan infeksi secara

oral pada tikus Fisher, penularan *Toxoplasma* pada fetus hanya terjadi pada tikus yang terinfeksi pertama kali saat kebuntingan (Zenner *et al.*, 1993).

2.10 Kebuntingan pada Mencit

Mencit betina umur 6-8 minggu telah mampu melakukan perkawinan dan bunting. Lama kebuntingan 19-20 hari. Mencit siap kawin hanya pada saat estrus. Siklus estrus mencit secara normal berlangsung 4 hari. Oosit dilepas dari ovarium masuk ampula oviduct. Di tempat tersebut fertilisasi terjadi.

Perkawinan terjadi pada malam hari. Sewaktu mencit kawin, ejakulan dari mencit jantan membeku di vagina mencit betina membentuk *plug*. *Plug* ini menjadi tanda telah terjadi perkawinan dan masih terlihat pada vagina dalam waktu yang lama bahkan lebih dari 18 jam. Pada hari diketemukannya *vaginal plug* dijadikan dasar umur kebuntingan dan dikatakan pada saat tersebut kebuntingan berumur 0, 1/2 atau 1 hari tergantung dari laboratorium setempat.

Setelah terjadi fertilisasi, zigot secara perlahan membelah diri dan bergerak dari oviduct ke uterus. Pada usia kebuntingan sekitar 3,5 – 4 hari, embrio (stadium blastosit) sampai pada uterus, tempat implantasi. Implantasi terjadi pada umur kebuntingan 5 hari. Implantasi blastosit menginduksi struma endometrium menebal dan terjadi banyak vaskularisasi. Di tempat tersebut terbentuk desidua, bagian dari plasenta yang berasal dari maternal. Plasenta terbentuk sempurna pada hari ke 9-9,5 umur kebuntingan. Plasenta rodensia, disusun oleh kompleks jaringan maternal dan fetal di daerah *materno-foetal interface*. Plasenta sebagai pemisah sirkulasi darah antara fetus dan maternal terdiri dari tiga lapis sel trofoblas: *Labyrinthine*, Spongiotrofoblas dan sel *Giant*. *Labyrinthine* dibentuk

sebagai bagian konus ektoplasenta yang menutupi embrio. Spongiotrofoblas dibentuk oleh konus ektoplasenta yang tidak diinvasi oleh pembuluh darah allantois. Sel *Giant trophoblast* membentuk garis batas terhadap desidua maternal. Jadi sel trofoblaslah yang kontak langsung dengan darah maternal, termasuk leukosit beserta protein produksinya. Kontak antara trofoblas dengan darah maternal dimulai pada hari ke 6,5 umur kebuntingan. Organogenesis mulai pada hari ke 10. (Arvola, 2001; Clark *et al.*, 2001; Monk, 1987; Medicine ucsd.edu, 2002)



BAB 3

KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS

3.1 Kerangka Konseptual

Secara imunologis kontrol terhadap *T. gondii* sangat kompleks dan melibatkan respons imun alami dan adaptif. *T. gondii* merupakan parasit intraseluler obligat, seperti patogen intraseluler lainnya, *T. gondii* membangkitkan respons imun seluler lebih dominan dibanding dengan respons humoral. Pada awal infeksi, imunitas terlihat tergantung pada makrofag dan sel NK. Sensitisasi *T. gondii* mendorong makrofag memproduksi IL-12. Interleukin-12, bersama-sama dengan IL-1 β , IL-15 dan TNF- α merangsang sel NK untuk memproduksi IFN- γ . Sitokin IFN- γ bekerja secara sinergis bersama TNF- α menginduksi ekspresi iNOS, yang menghasilkan NO untuk membunuh *T. gondii* intraseluler. Pada tingkat adaptif, imunitas diperankan oleh sel T. Sitokin IL-12 yang dihasilkan oleh makrofag atau APC mendorong diferensiasi sel Th0 dan reaksi secara kuat ke arah Th 1 dengan memproduksi IFN- γ . Makrofag atau APC mampu mengekspresikan MHC I sehingga dapat dikenali oleh sel T CD8+ (CTL). Sel Th juga menghasilkan IL-2 yang dapat memicu sel T sitolitik (sel T CTL atau sel T CD8) menghasilkan IFN- γ . Selanjutnya, sitokin ini penting untuk aktivasi makrofag dan untuk mendorong fungsi makrofag sebagai mikrobisida. Makrofag yang teraktivasi akan menghasilkan TNF- α dan NO. (Denkers dan Gazzinelli, 1998; Johnson, 1990; Roberts *et al.*, 2001)

Diuraikan di atas bahwa *T. gondii* menginfeksi semua tipe sel termasuk berbagai sel di uterus, sehingga reaksi imun juga terjadi di uterus (khususnya di desidua). Populasi leukosit pada desidua didominasi oleh makrofag, sel NK dan

sel T CTL, sedangkan sel Th dalam jumlah kecil (Baines, 2002; Vince dan Johnson, 2000). Sel NK yang teraktivasi mengeluarkan $INF\gamma$. Sitokin $INF\gamma$ produksi sel NK mengaktivasi makrofag memproduksi faktor sitolitik meliputi NO, oksigen radikal dan $TNF-\alpha$. Faktor litik tersebut mengganggu perkembangan plasenta karena mengakibatkan kerusakan sel plasenta (Baines, 2002).

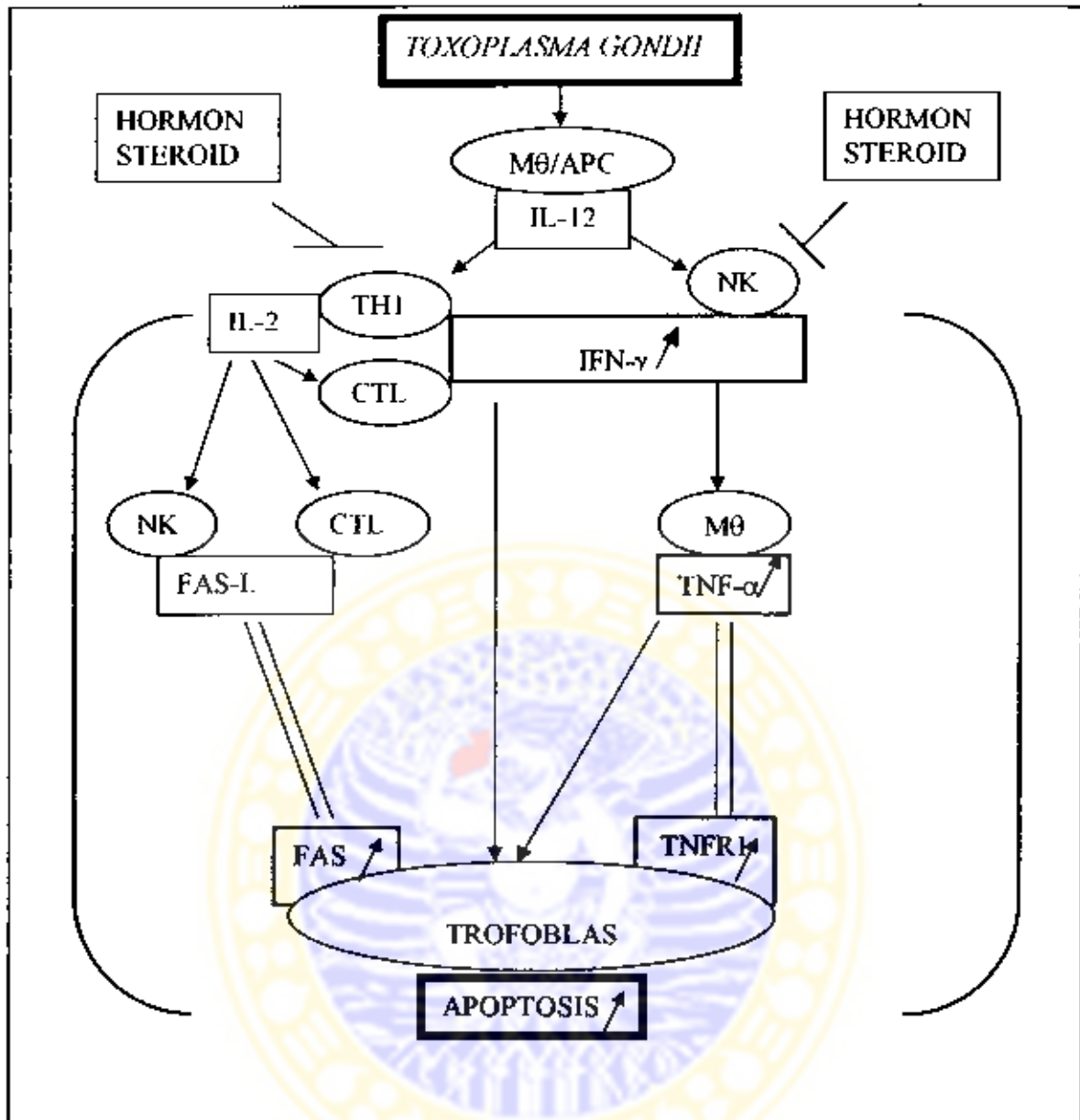
Analog dengan pendapat Baines (2002) serta Vince dan Johnson (2000), $INF\gamma$ yang dihasilkan oleh sel NK, Th1 dan sel T CTL karena stimulasi infeksi *T. gondii* diperkirakan juga mengaktivasi makrofag desidua untuk memproduksi $TNF-\alpha$. Peningkatan sitokin $TNF-\alpha$ sebagai akibat peningkatan $INF\gamma$ memicu kematian plasenta secara apoptosis. Sebagai ligan, $TNF-\alpha$ dapat memicu apoptosis sel dengan cara mengaktifkan reseptor TNF tipe 1 (TNFR-I) permukaan membran. (Rayet *et al.*, 1998) sedangkan trofoblas memiliki TNFR-I (Dumur *et al.*, 2001; Phillips *et al.*, 2001). Ikatan $TNF-\alpha$ dengan TNFR-I yang dimiliki trofoblas mengakibatkan trofoblas mengalami apoptosis.

Sitokin IL-2 yang dihasilkan oleh sel Th1 karena rangsangan infeksi *T. gondii* diperkirakan mengaktifkan sel T CTL dan sel NK desidua mengekspresikan Fas Ligan. Hal ini sesuai pendapat Goldsby *et al.* (2000) yang mengatakan sel T dan sel NK yang teraktivasi oleh IL-2 akan mengekspresikan Fas Ligan. Ikatan Fas Ligan sel T CTL dan NK dengan Fas yang dimiliki oleh trofoblas memicu kejadian apoptosis trofoblas (Dumur *et al.*, 2001; Phillips *et al.*, 2001). Dalam keadaan kebuntingan normal, trofoblas mengekspresikan Fas dalam kadar yang sangat rendah dan tahan terhadap induksi apoptosis, tetapi keberadaan $INF\gamma$ dan $TNF-\alpha$, sebagai respons terhadap infeksi *T. gondii*, akan meningkatkan

ekspresi Fas dan kepekaan terhadap induksi apoptosis (Aschkenazi *et al.*, 2002; Balkundi, *et al.*, 2003).

Plasenta mensekresikan hormon steroid, estrogen dan progesteron dalam jumlah yang banyak. Kadar hormon tersebut meningkat secara tajam selama kebuntingan dan peningkatan tersebut sejalan dengan umur kebuntingan. Konsekuensi dari peningkatan ini membawa pengaruh terhadap sistem imun maternal, baik respons imun adaptif maupun alami. Kedua hormon tersebut menekan sel imun seperti sel NK dan sel T. Pada sel NK, progesteron menyebabkan penurunan jumlah, aktivitas dan toksisitas sel NK, sedang pada sel T progesteron menghambat proliferasi limfosit T dan mengubah keseimbangan Th1/Th2 ke arah Th2 (Dosiou dan Giudice, 2005; Kawana *et al.*, 2005; Roberts *et al.*, 2001; Spencer, 2004). Perubahan kadar hormon pada tiap umur kebuntingan tentu mempengaruhi aktivitas dan jumlah sel NK dan sel T sebagai penghasil IFN- γ , apabila teraktivasi oleh suatu rangsangan agen infeksi (Abbas *et al.*, 2000; Goldby *et al.*, 2000). Perubahan tersebut diperkirakan juga berpengaruh pada kejadian apoptosis sel trofoblas, karena peningkatan apoptosis trofoblas terjadi sebagai akibat aktivasi sel NK dan T di desidua (Olivarse *et al.*, 2002).

Dari konsep-konsep di atas dapat digambarkan seperti gambar berikut:



Gambar 6. Kerangka Konseptual Penelitian

Keterangan: F1 : Infeksi *Toxoplasma gondii* pada mencit bunting

F2 : Apoptosis Trofoblas

() : daerah pengamatan, *maternal-fetal interface*

→ : menginduksi

|| : terjadi ikatan

—| : menghambat

3.2 Hipotesis

Terdapat perbedaan respons inflamasi plasenta antara mencit yang diinfeksi *T. gondii* dengan mencit yang tidak diinfeksi, baik pada umur kebuntingan minggu pertama, kedua maupun ketiga, berdasarkan pada peningkatan persentase jumlah limfosit desidua penghasil IFN- γ , persentase jumlah makrofag desidua penghasil TNF- α , persentase jumlah trofoblas yang mengekspresikan Fas dan TNFR-1 serta indeks apoptosis trofoblas

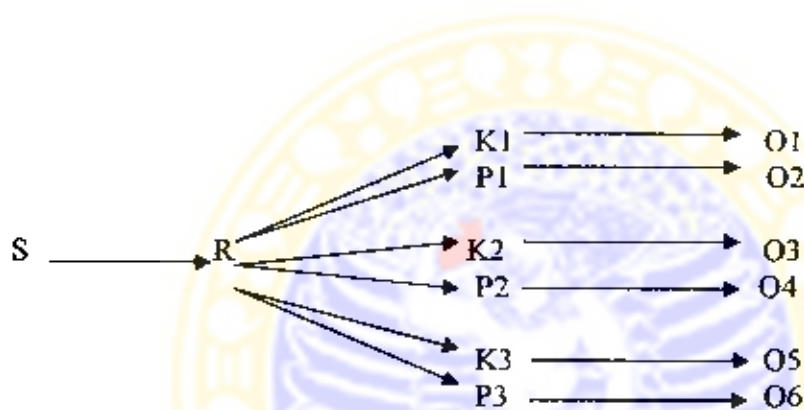


BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental. *Randomized posttest only control group design* merupakan rancangan penelitian yang dipilih, karena pengukuran awal tidak mungkin dilakukan. Gambar dibawah adalah skema pola rancangan penelitian:



Gambar 7. Skema Pola Rancangan Penelitian.

Keterangan:

- S** : Sampel mencit bunting umur kebuntingan 0,5 hari.
R : Randomisasi, secara acak sampel dipisahkan menjadi 6 kelompok.
K : Kelompok kontrol (kelompok mencit tidak diinfeksi; K1, K2 dan K3 berturut-turut adalah mencit bunting umur kebuntingan 4,5 hari; 9,5 hari dan 14,5 hari).
P : Kelompok Perlakuan (P1, P2 dan P3 berturut-turut adalah mencit yang diinfeksi dengan *T. gondii* pada umur kebuntingan 4,5 hari; 9,5 hari dan 14,5 hari).
O1, O2, O3, O4, O5 dan O6: Pengamatan terhadap jumlah sel apoptotik dan jumlah sel yang mengekspresikan IFN- γ , TNF- α , TNFR1 dan Fas (pengamatan dilakukan 4 hari setelah infeksi).

4.2 Sampel, Besar Sampel dan Teknik Pengambilan Sampel

1. Sampel: mencit betina sehat umur 2 bulan, bunting, dari galur Swiss. Umur kebuntingan 4,5 hari, 9,5 hari dan 14,5 hari .
2. Besar Sampel: besar sampel ditentukan berdasarkan rumus Steel dan Torrie. (1991)

$$n = \frac{t_1^2 s^2}{d^2}$$

- n = besar sampel
 d = setengah selisih rerata
 s = Simpangan baku
 t₁ = t tabel pada (α = 0,05)

Dari penelitian pendahuluan diperoleh data seperti terlampir dan setelah dimasukkan dalam rumus di atas diperoleh nilai n = 7,123 maka pada penelitian ini ditentukan besar sampel 8 untuk per kelompok perlakuan. Jadi setiap kelompok perlakuan terdiri dari 8 ekor mencit sehingga total mencit dalam penelitian ini 48 ekor mencit bunting. (Lampiran 2).

4.3 Variabel Penelitian

4.3.1 Klasifikasi variabel

1. Variabel bebas : Infeksi *Toxoplasma gondii*.
2. Variabel tergantung: respons inflamasi plasenta mencit yang dinyatakan dengan persentase jumlah limfosit desidua yang mengekspresikan IFN-γ, persentase jumlah makrofag desidua yang mengekspresikan TNF-α, persentase jumlah sel trofoblas yang mengekspresikan Fas dan TNFR-1 serta indeks apoptosis sel trofoblas.

3. Variabel kendali: Dosis infeksi, strain *T. gondii*, umur mencit, galur mencit dan umur kebuntingan.

4.3.2 Definisi operasional

1. Infeksi *Toxoplasma gondii* dalam penelitian ini adalah infeksi buatan pada hewan coba. Mencit Swiss betina bunting (umur kebuntingan 4,5 hari, 9,5 hari dan 14,5 hari) diinfeksi dengan isolat *T. gondii* stadium takizoit dengan dosis 1×10^3 takizoit per mencit, secara intraperitoneal. Pada saat dikorbankan, cairan peritoneal mencit diambil untuk diamati keberadaan takizoit *T. gondii* sebagai bukti bahwa mencit telah terinfeksi.
2. Apoptosis trofoblas adalah angka yang diperoleh berdasarkan penghitungan indeks apoptosis. Indeks apoptosis merupakan hasil pembagian jumlah inti sel trofoblas yang mengalami apoptosis dengan jumlah total inti sel dikalikan 100 persen pada setiap preparat organ plasenta yang diwarnai dengan apoptag. Di bawah mikroskop Pembesaran 400 kali, 6 lapang pandang dari tiap plasenta (labyrinthine dan spongiotrofoblas) ditentukan secara acak untuk dihitung jumlah sel yang mengalami apoptotik. Sel dikatakan mengalami apoptotik apabila inti berwarna coklat kehitaman, dan negatif apabila inti berwarna hijau. (Runic *et al.*, 1998).
3. Sel desidua penghasil IFN- γ dan TNF- α , adalah angka yang diperoleh berdasarkan penghitungan persentase jumlah limfosit desidua yang mengekspresikan IFN- γ dan persentase jumlah makrofag desidua yang mengekspresikan TNF- α pada pewarnaan imunohistokimia organ plasenta.

Di bawah mikroskop Pembesaran 400 kali, 6 area di desidua basalis ditentukan untuk dihitung frekuensi sel yang positif. Sel dikatakan positif mengekspresikan IFN- γ dan TNF- α apabila sitoplasma sel berwarna coklat kehitaman, dan dikatakan negatif apabila sitoplasma berwarna biru (Burnett dan Hunt, 2000).

4. Trofoblas penghasil Fas dan TNFR-1 adalah jumlah persentase trofoblas yang mengekspresikan Fas dan TNFR-1 pada pewarnaan imunohistokimia organ plasenta. Di bawah mikroskop Pembesaran 400 kali, 6 area di labyrinthine dan spongiotrofoblas ditentukan untuk dihitung frekuensi sel yang positif. Penentuan sel positif sama seperti butir 3 di atas.
5. Respons inflamasi plasenta ditentukan berdasarkan pengamatan perubahan persentase jumlah limfosit desidua penghasil IFN- γ , persentase jumlah makrofag desidua penghasil TNF- α , persentase jumlah trofoblas yang mengekspresikan Fas dan TNFR-1 serta indeks apoptosis trofoblas.
6. Pola respons inflamasi plasenta adalah gambaran dalam bentuk diagram batang yang mencerminkan kontribusi dari variabel dominan terhadap modulasi respons inflamasi plasenta pada mencit terinfeksi *T. gondii* dan tidak terinfeksi yang mendasari peningkatan apoptosis trofoblas. Gambaran kontribusi modulasi respons inflamasi plasenta dibuat berdasarkan hasil perhitungan skor diskriminan tiap variabel dominan.

4.4 Unit Analisis

Unit analisis adalah plasenta mencit Swiss bunting.

4.5 Prosedur Penelitian

4.5.1 Hewan Coba

Hewan percobaan adalah mencit betina umur 2 bulan galur Swiss. Hewan coba diperoleh dari laboratorium Hewan Coba Fakultas Farmasi Universitas Sanata Dharma Jogjakarta.

4.5.2 Isolat *T gondii*

Isolat *T. gondii* yang dipergunakan galur RH yang diperoleh dari Pusat Studi Bioteknologi Universitas Gadjah Mada Jogjakarta. Isolat diperbanyak dengan cara dipasasekan ke mencit. Mencit diinjeksi secara intraperitoneal. Dosis injeksi 10^3 takizoit tiap mencit. Penentuan dosis didasarkan pada hasil penelitian Amirudin (1999). Menurut Amirudin (1999) 4 hari setelah infeksi, semua mencit yang diinfeksi dengan 10^3 takizoit masih bertahan hidup. Empat hari atau setelah mencit menunjukkan gejala mencit lemah dan bulu berdiri, mencit dikorbankan dan diambil cairan peritoneal. Ke dalam cavum peritoneum mencit ditambahkan 5 ml NaCl fisiologis dan cairan diambil kembali. Parasit dalam cairan peritoneal dihitung dengan hemositometer.

4.5.3 Perlakuan

Untuk mendapatkan umur kebuntingan yang sama, 48 ekor mencit betina umur 2 bulan digertak kombinasi 5 IU PMSG dan 5 IU HCG. Mencit betina diinjeksi dengan PMSG dan 48 jam kemudian diinjeksi dengan HCG secara subkutan. Setelah penyuntikan HCG, mencit dikawinkan dengan pejantan. Satu ekor mencit betina dikandangkan dengan satu ekor mencit jantan. Biasanya,

mencit kawin pada malam hari. Keesokan harinya pada vagina mencit betina diperiksa keberadaan *vaginal plug*. Apabila *vaginal plug* positif berarti mencit telah bunting 0,5 hari (Clark *et al.*, 1998). Mencit bunting dibagi secara acak menjadi 6 kelompok, sebagai berikut:

K1: kelompok kontrol, mencit bunting 4,5 hari (minggu pertama)
tidak diinfeksi

K2: kelompok kontrol, mencit bunting 9,5 hari (minggu kedua)
tidak diinfeksi

K3: kelompok kontrol, mencit bunting 14,5 hari (minggu ketiga)
tidak diinfeksi

P1: kelompok perlakuan mencit bunting 4,5 hari (minggu pertama)
diinfeksi

P2: kelompok perlakuan mencit bunting 9,5 hari (minggu kedua)
diinfeksi

P3: kelompok perlakuan mencit bunting 14,5 hari (minggu ketiga)
diinfeksi

Dosis infeksi tiap mencit 10^3 takizoit secara intraperitoneal. Sehubungan dengan dampak toxoplasmosis pada ibu hamil dikelompokan berdasarkan umur kehamilan trimester pertama, kedua dan ketiga sedangkan umur kebuntingan mencit antara 19-20 hari, maka pada penelitian ini pembagian umur kebuntingan disesuaikan dan menjadi minggu pertama, kedua dan ketiga. Mencit bunting umur 4,5 hari mewakili kelompok kebuntingan minggu pertama, mencit bunting umur 9,5 hari mewakili kelompok kebuntingan minggu kedua dan mencit bunting umur 14,5 hari mewakili kelompok kebuntingan minggu ketiga. Empat hari setelah

infeksi, mencit dikorbankan untuk dilakukan pengamatan. Penentuan waktu pengorbanan mencit 4 hari setelah infeksi didasarkan asumsi bahwa pada hari ke-4 setelah infeksi parasit telah mencapai daerah plasenta. Hal ini juga didukung oleh Dubey *et al.* (1998) yang mengatakan bahwa *T. gondii* mencapai di berbagai organ dalam waktu 24–48 jam setelah infeksi. Plasenta mencit diambil untuk dilakukan pengecatan histokimia untuk penghitungan indeks apoptosis trofoblas dan pewarnaan imunohistokimia untuk mengetahui persentase jumlah limfosit yang menghasilkan IFN- γ , persentase jumlah makrofag yang menghasilkan TNF- α , persentase jumlah trofoblas yang menghasilkan Fas dan TNFR-1. Plasenta difiksasi dalam buffer formalin 10 % untuk dilakukan *embedding paraffin*.

4.5.4 Penentuan apoptosis trofoblas dengan TUNEL ASSAY

Metode seperti yang dilakukan (Runic *et al.*, 1998) dengan menggunakan *Apoptotic kit Apop tag* (Daco). Sayatan plasenta setebal 4-5 μm dalam *embedding paraffin*, dideparafinisasi dengan Xylene 3 kali, ethanol absolut 2 kali, ethanol 95% 1 kali, ethanol 70% 1 kali, dan terakhir dengan PBS. Jaringan ditetesi proteinase K selama 15 menit, lalu dicuci 2 kali dengan dH₂O. Untuk menghilangkan *endogenous peroxidase*, jaringan ditetesi 3% H₂O₂ PBS selama 5 menit pada suhu kamar, lalu dicuci 2 kali dengan PBS masing-masing 2 menit. Jaringan diinkubasikan dalam buffer yang berisi digoxigenin yang dilabel deoxy-UTP dan terminal deoxynucleotidyl transferase pada suhu 37°C di tempat yang lembab selama 1 jam. Sampel lalu dicuci 3 kali dengan PBS, kemudian ditambahkan konjugat peroksidase anti-digoxigenin dan diinkubasikan dalam suhu ruangan selama 30 menit. Selanjutnya slide dicuci 4 kali dengan PBS,

kemudian ditambah diaminobenzidine dan diinkubasikan selama 5 menit. Cuci tiga kali dengan PBS dan ditambahkan *counterstain* methyl green (Sigma), kemudian dicuci 3 kali dengan dH₂O. Preparat selanjutnya dikeringkan dan ditutup dengan *cover glass*.

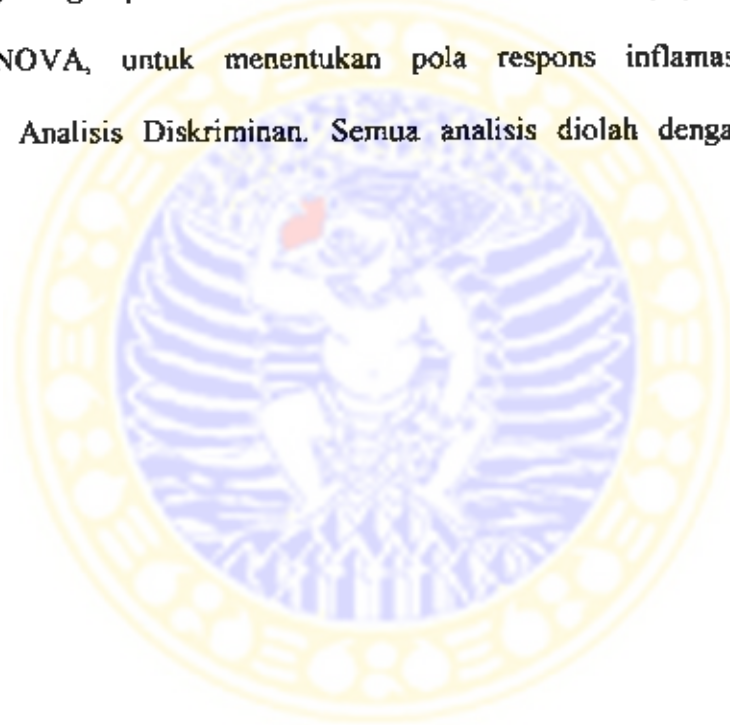
4.5.5 Pengecatan imunohistokimia

Untuk pengecatan imunohistokimia dipergunakan streptavidin dan biotin (Instruction Dako LSAB + Kit, Peroxidase). Potong setebal 4-5 μ m plasenta dalam *embedding* paraffin. Masing-masing sampel 4 sayatan. Sayatan pertama, kedua, ketiga dan keempat secara terpisah dan secara berturut-turut untuk pengamatan ekspresi IFN- γ , TNF- α , TNFR-1 dan Fas. Slide dideparafinisasi dalam xylol 2 kali masing-masing 5 menit, selanjutnya secara berturut-turut dimasukkan dalam ethanol absolut 2 kali 3 menit, ethanol 95% 2 kali masing-masing 3 menit dan ethanol 70% 3 menit. Terakhir dicuci dengan aquabides. Slide ditetesi dengan proteinase K 5 menit. Cuci dengan PBS 2 kali, selanjutnya ditetesi *hydrogen peroxidase* (H₂O₂) 3 % selama 5 menit dan dicuci dengan PBS 2 kali. Setiap sayatan diinkubasi dalam antibodi poliklonal kelinci terhadap IFN- γ , TNF- α , TNFR-1 dan Fas *anti-mouse* 30 menit. Selanjutnya tiap sayatan diinkubasi dalam antibodi sekunder yang dilabel dengan biotin (Link) selama 30 menit, dicuci dengan PBS 2 kali. Selanjutnya preparat ditetesi dengan streptavidin proxidase selama 15-30 menit cuci dengan PBS 2 kali dan terakhir dimasukkan dalam larutan substrat 3,3-diaminobenzidine tetrahydrochloride in H₂O₂ in Tris buffe pH 7,4 selama 5-10 menit. Untuk *counterstain*, dimasukkan dalam

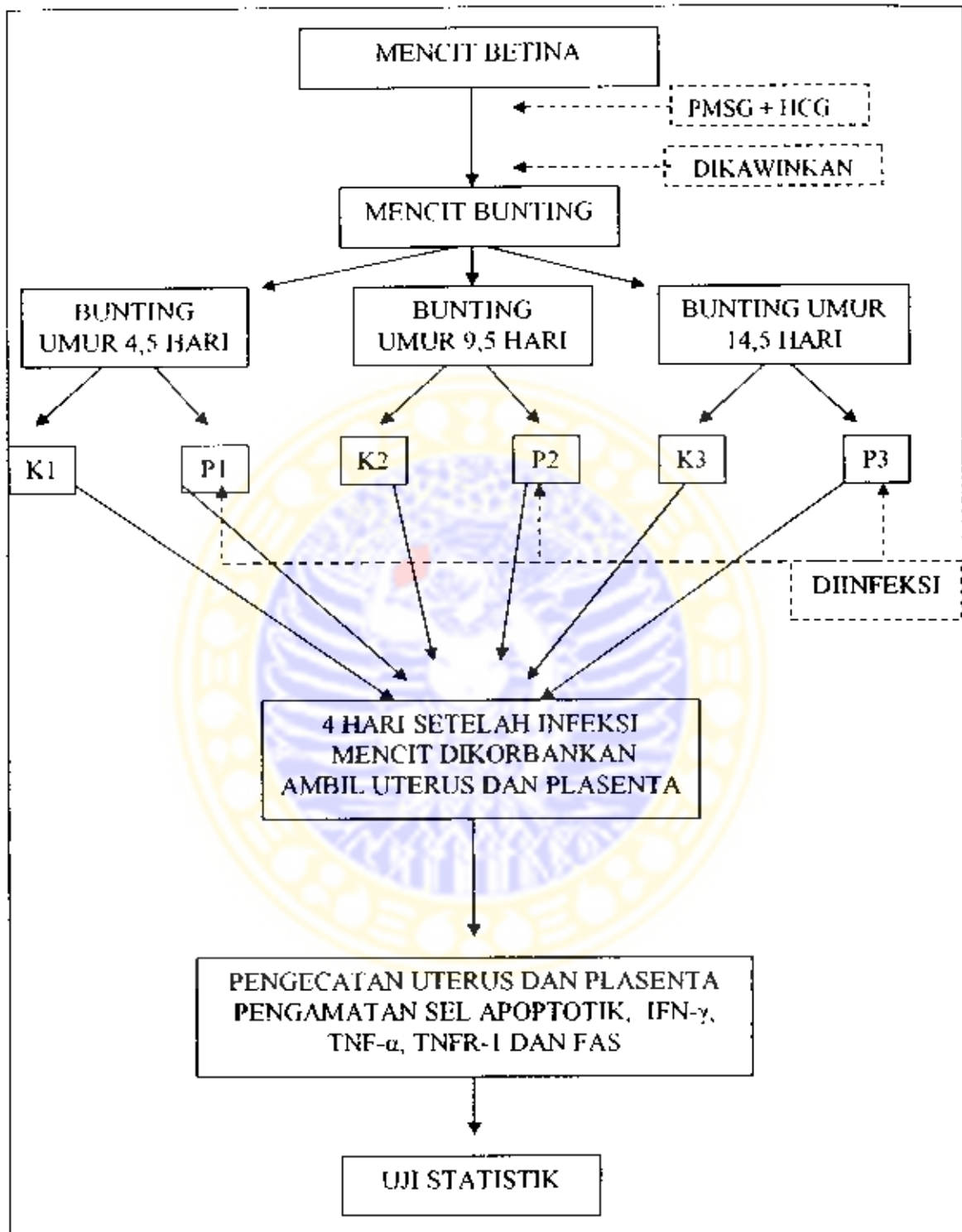
hematoxylin 30 detik pada suhu kamar kemudian dicuci 3 kali dengan dH₂O. Preparat selanjutnya dikeringkan dan ditutup dengan *cover glass*.

4.6 Analisis Data

Analisis efek infeksi *T. gondii* terhadap respons inflamasi plasenta berdasarkan pengamatan perubahan persentase jumlah limfosit desidua penghasil IFN- γ , persentase jumlah makrofag desidua penghasil TNF- α , persentase jumlah trofoblas yang mengekspresikan Fas dan TNFR-1 serta indeks apoptosis trofoblas dengan MANOVA, untuk menentukan pola respons inflamasi plasenta menggunakan Analisis Diskriminan. Semua analisis diolah dengan program SPSS.



KERANGKA OPERASIONAL PENELITIAN



BAB 5

HASIL PENELITIAN

5.1 Pemeriksaan Titer Antibodi terhadap *T. gondii*

Untuk menentukan mencit sebagai hewan coba terbebas dari infeksi *T. gondii* dilakukan pemeriksaan titer antibodi terhadap *T. gondii* sebelum mencit dikawinkan. Darah diambil dari sinus orbitalis dari 10 ekor mencit secara acak. Selanjutnya, serum dikirim ke bagian Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta. Penentuan titer antibodi dengan *DA test*. Hasil pemeriksaan menunjukkan titer antibodi semua serum adalah 0 (no) (lihat Lampiran 1). Hal ini menunjukkan bahwa mencit yang dipergunakan dalam penelitian, sebelum diberi perlakuan, bebas dari infeksi *T. gondii*.

5.2 Pemeriksaan Parasitologis pada Mencit Terinfeksi *T. gondii*

Mencit dari kelompok perlakuan dinyatakan terinfeksi *T. gondii* apabila di dalam cairan peritoneal ditemukan takizoit *T. gondii*. Pada saat pembedahan, 4 hari setelah infeksi, cairan peritoneal diambil dari masing-masing mencit perlakuan. Selanjutnya, cairan peritoneal diamati dibawah mikroskop dengan pembesaran 100 kali. Di bawah mikroskop, takizoit terlihat seperti bentukan pisang (lihat Gambar 8) dan bergerak. Dari hasil pengamatan mikroskopis, cairan peritoneal dari semua mencit kelompok terinfeksi ditemukan takizoit. Hal ini menunjukkan bahwa semua mencit kelompok perlakuan terinfeksi *T. gondii*. Meskipun tidak termasuk dalam tujuan penelitian ini, jumlah takizoit dalam cairan peritoneal dari tiap kelompok umur

kebuntingan dilakukan penghitungan dan analisis dengan hasil seperti terlihat pada Tabel 1 dan lampiran 4. Jumlah takizoit dalam cairan peritoneal mencit kelompok kebuntingan minggu pertama, kedua, dan ketiga berbeda nyata ($p < 0,05$). Dari *post hoc test* (Uji LSD) terlihat bahwa jumlah takizoit pada setiap kelompok umur kebuntingan berbeda nyata ($p < 0,05$). Jumlah takizoit meningkat sesuai dengan peningkatan umur kebuntingan saat mendapatkan infeksi. Jumlah takizoit dalam cairan peritoneal terbanyak terdapat pada kelompok infeksi pada umur kebuntingan minggu ketiga, yaitu $5,98 \times 10^8$, diikuti kelompok infeksi pada umur kebuntingan minggu kedua: $5,15 \times 10^8$, dan yang paling sedikit pada kelompok infeksi pada umur kebuntingan minggu pertama: $3,54 \times 10^8$.

Tabel 1. Rerata dan Simpangan Baku serta Hasil Uji Beda Jumlah Takizoit *T. gondii* dalam Cairan Peritoneal Mencit Bunting.

Umur Kebuntingan saat mendapatkan infeksi	Rata-rata (dalam 10^8)	Simpangan Baku (dalam 10^8)
Minggu I	3,5413 ^a	0,5076
Minggu II	5,1494 ^b	0,9025
Minggu III	5,9788 ^c	0,7267

Keterangan: Huruf yang berbeda pada nilai rerata menunjukkan perbedaan yang bermakna $p < 0,05$.

Tabel 2. Rerata dan Simpangan Baku serta Hasil Uji Beda Respons Inflamasi Plasenta Mencit yang Terinfeksi dan Tidak Terinfeksi.

Variabel	Kelompok		F	P
	Tidak Infeksi	Infeksi		
Persentase Limfosit Desidua Penghasil IFN- γ	25,4885 $\pm 7,7257$	45,2567 $\pm 6,9499$	184,615	0,000
Persentase Makrofag Desidua Penghasil TNF- α	16,2487 $\pm 9,0323$	32,0831 $\pm 7,2954$	57,854	0,000
Persentase Sel Trofoblas yang mengekspresikan Fas	6,8871 $\pm 4,4362$	35,6837 $\pm 13,5562$	120,135	0,000
Persentase Sel Trofoblas yang mengekspresikan TNFR1	12,7699 $\pm 8,5365$	34,6046 $\pm 8,8017$	71,171	0,000
Indeks Apoptosis Trofoblas	17,3276 $\pm 11,7230$	49,1261 $\pm 8,3923$	371,775	0,000

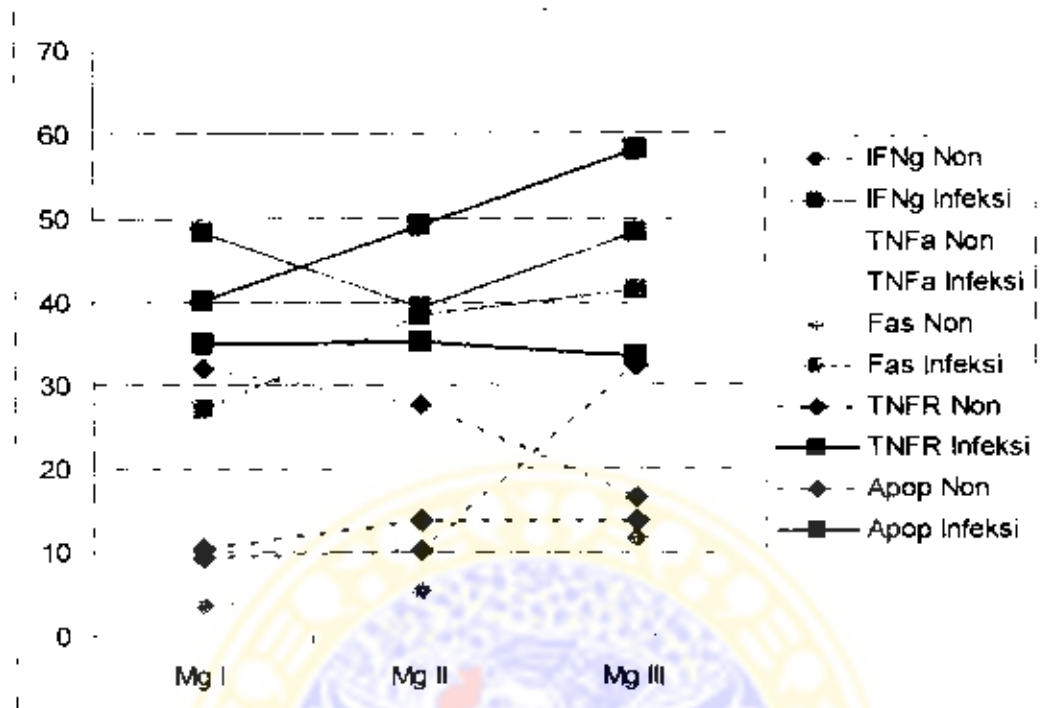
Wilks' Lambda = 0,060 p = 0,000.

Selanjutnya, untuk melihat perbedaan antara mencit yang tidak terinfeksi dan terinfeksi pada umur kebuntingan minggu pertama, kedua, dan ketiga dilakukan *multiple comparisons* dengan uji LSD. Pada tiap kelompok pengamatan terdapat perbedaan seperti terlihat pada Tabel 3 dan Lampiran 5. Hasil tersebut menunjukkan bahwa pada kelompok mencit terinfeksi, baik pada umur kebuntingan minggu pertama, kedua, dan ketiga, ada peningkatan yang tajam dari setiap variabel yang diukur apabila dibandingkan dengan kelompok mencit yang tidak diinfeksi. Pola peningkatan tersebut terlihat jelas pada Gambar 9. Pada Tabel 3 juga terlihat terdapat perbedaan setiap variabel pada tiap umur kebuntingan mencit kecuali persentase sel trofoblas yang mengekspresikan TNFR-1.

Tabel 3. Rerata dan Simpangan Baku serta Hasil Uji Beda (LSD) Respons Inflamasi Plasenta Mencit Tidak Terinfeksi dan Terinfeksi pada Umur Kebuntingan Minggu Pertama, Kedua, dan Ketiga.

Variabel	Perlakuan	Umur Kebuntingan		
		Minggu I	Minggu II	Minggu III
Persentase limfosit Desidua Penghasil IFN- γ	Tidak Infeksi	32.05 ^a ± 6.26	27.67 ^c ± 2.86	16.74 ^e ± 2.59
	Infeksi	48.14 ^b ± 3.99	39.32 ^d ± 7.53	48.31 ^b ± 5.06
Persentase makrofag Desidua Penghasil TNF- α	Tidak Infeksi	23.99 ^l ± 5.48	14.12 ^h ± 9.30	10.64 ^h ± 6.47
	Infeksi	35.59 ^g ± 6.13	30.47 ⁱ ± 5.38	30.18 ⁱ ± 9.34
Persentase Sel Trofoblas yang mengekspresikan Fas	Tidak Infeksi	3.65 ^j ± 1.42	5.37 ^j ± 2.19	11.64 ^m ± 4.18
	Infeksi	27.11 ^k ± 13.63	38.50 ^l ± 15.23	41.44 ^l ± 7.42
Persentase Sel Trofoblas yang mengekspresikan TNFR1	Tidak Infeksi	10.40 ⁿ ± 3.50	13.94 ⁿ ± 10.59	13.97 ^o ± 10.27
	Infeksi	35.01 ^o ± 7.96	35.28 ^o ± 9.66	33.52 ^o ± 9.79
Indeks Apoptosis Trofoblas	Tidak Infeksi	9.33 ^p ± 2.54	10.19 ^p ± 2.60	32.46 ^s ± 6.74
	Infeksi	40.19 ^q ± 5.38	49.11 ^r ± 4.08	58.08 ^t ± 1.77

Keterangan: Huruf yang berbeda pada nilai rerata tiap variabel menunjukkan perbedaan yang bermakna $p < 0,05$.



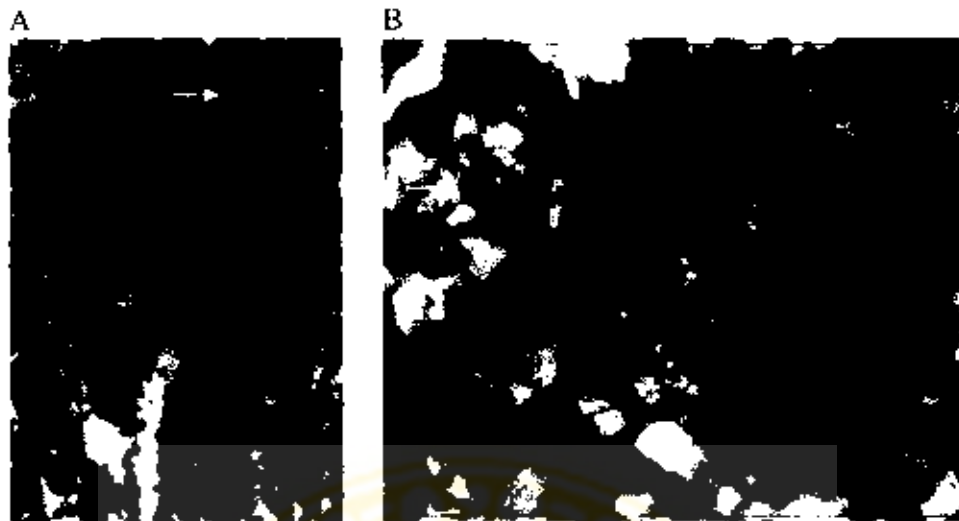
Gambar 9. Rerata persentase jumlah limfosit desidua yang menghasilkan IFN- γ , persentase jumlah makrofag desidua yang menghasilkan TNF- α , persentase jumlah sel trofoblas yang mengekspresikan Fas, persentase jumlah sel trofoblas yang mengekspresikan TNFR-I dan indeks apoptosis trofoblas

Secara rinci perubahan tiap variabel yang diukur tersebut adalah sebagai berikut:

1. Persentase jumlah limfosit desidua penghasil IFN- γ .

Dari Tabel 2 terlihat bahwa persentase jumlah limfosit desidua yang menghasilkan IFN- γ pada mencit yang diinfeksi *T. gondii* berbeda nyata dengan kelompok mencit yang tidak diinfeksi ($p < 0,01$). Pada kelompok mencit yang terinfeksi (45,2567%) terlihat terjadi peningkatan bila dibanding dengan mencit tidak terinfeksi (25,4885%). Secara rinci perbedaan antara mencit tidak diinfeksi dengan diinfeksi pada setiap umur kebuntingan dapat

dilihat pada Tabel 3. Perbedaan tersebut adalah sebagai berikut: pada umur kebuntingan minggu pertama: 32,05% berbanding dengan 48,18% (terjadi peningkatan 1,5 kali), pada minggu kedua: 27,67% berbanding dengan 39,32% (peningkatan 1,4 kali), dan pada minggu ketiga: 16,74% berbanding dengan 48,31% (peningkatan 2,9 kali). Dari uji LSD, juga terlihat ada perbedaan pada tiap kelompok perlakuan, kecuali pada kelompok yang diinfeksi minggu pertama dan ketiga. Pada mencit yang tidak diinfeksi, ekspresi IFN- γ menurun secara tajam sejalan dengan umur kebuntingan, persentase jumlah limfosit desidua penghasil IFN- γ tertinggi pada mencit bunting minggu pertama, dan terendah pada minggu ketiga. Sedangkan pada kelompok mencit terinfeksi, pada umur kebuntingan minggu pertama tinggi, menurun pada umur kebuntingan kedua, dan meningkat lagi pada umur kebuntingan minggu ketiga. Ekspresi IFN- γ pada mencit terinfeksi minggu pertama tidak berbeda nyata dengan pada minggu ketiga ($p > 0,05$). Gambar 10 di bawah adalah limfosit desidua penghasil IFN- γ .



Gambar 10. Limfosit Desidia Mencit Penghasil IFN- γ . Pewarnaan imunohistokimia dengan antibodi poliklonal kelinci anti-IFN- γ . A. Pembesaran 100x, B. Pembesaran 400 x. Tanda panah merah (\rightarrow) sel yang positif. Tanda panah kuning (\rightarrow) sel yang negatif.

2. Persentase jumlah makrofag desidua yang menghasilkan TNF- α :

Persentase jumlah makrofag desidua yang menghasilkan TNF- α pada mencit yang diinfeksi *T. gondii* meningkat bila dibanding dengan kelompok mencit tidak terinfeksi, dari 16,2487% pada yang tidak terinfeksi menjadi 32,0831 pada yang infeksi (Tabel 2). Peningkatan secara rinci pada tiap umur kebuntingan (Tabel 3) adalah sebagai berikut: pada umur kebuntingan minggu pertama meningkat 1,5 kali (23,99% pada mencit tidak terinfeksi dan 35,59% pada mencit terinfeksi), pada minggu kedua meningkat 2,2 kali (14,12% pada mencit tidak terinfeksi dan 30,47% pada mencit terinfeksi), dan pada minggu ketiga meningkat 2,8 kali (10,64% pada mencit tidak terinfeksi dan 30,18% pada mencit terinfeksi). Berdasarkan umur kebuntingan mencit, baik pada

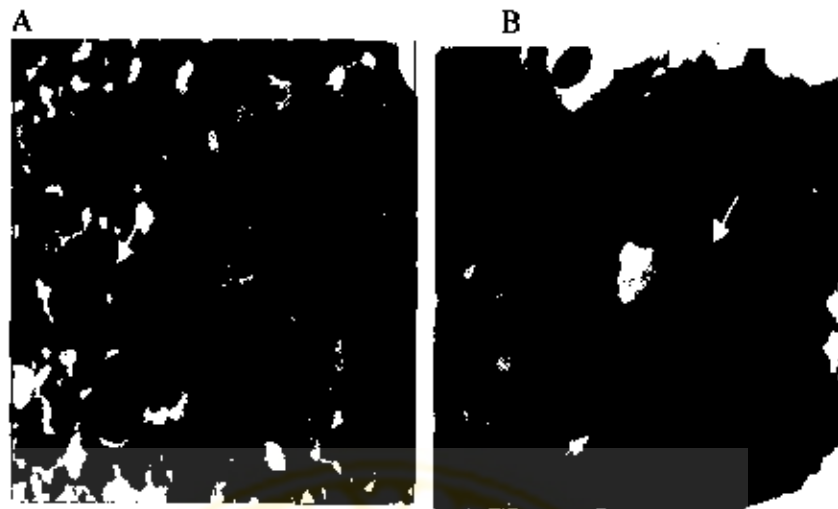
mencit yang tidak diinfeksi maupun yang diinfeksi, persentase jumlah makrofag desidua yang menghasilkan TNF- α tertinggi pada kebuntingan minggu pertama dan mulai menurun pada umur kebuntingan minggu kedua dan ketiga. Persentase jumlah makrofag desidua yang menghasilkan TNF- α pada minggu pertama berbeda nyata dengan persentase TNF- α pada umur kebuntingan minggu kedua dan ketiga, sedangkan persentase jumlah makrofag desidua yang menghasilkan TNF- α pada kelompok umur kebuntingan minggu kedua dan ketiga tidak berbeda nyata. Gambar 11 di bawah adalah makrofag desidua yang menghasilkan TNF- α .



Gambar 11. Makrofag Desidua yang Menghasilkan TNF- α . Pewarnaan imunohistokimia dengan antibodi poliklonal kelinci anti- TNF- α . A. Pembesaran 100x, B. Pembesaran 400 x. Tanda panah merah (\rightarrow): sel yang positif. Tanda panah kuning () sel yang negatif.

3. Persentase Jumlah Sel Trofoblas yang Mengekspresikan Fas:

Pada kelompok mencit yang diinfeksi *T. gondii* apabila dibandingkan dengan kelompok tidak terinfeksi, terlihat persentase jumlah sel trofoblas yang mengekspresikan Fas meningkat secara tajam, dari 6,8871% pada kelompok tidak infeksi menjadi 35,6837% pada kelompok mencit terinfeksi (Tabel 2). Peningkatan tersebut juga terlihat pada setiap kelompok umur kebuntingan (Tabel 3). Pada kelompok umur kebuntingan minggu pertama: 3,65% pada mencit tidak terinfeksi dan 27,11% pada mencit terinfeksi (meningkat 7,4 kali), pada minggu kedua: 5,37% pada mencit tidak terinfeksi dan 38,50% pada mencit terinfeksi (meningkat 7,2 kali), sedangkan pada minggu ketiga: 11,64% pada mencit tidak terinfeksi dan 41,44% pada mencit terinfeksi (meningkat 3,6 kali). Persentase jumlah sel trofoblas yang mengekspresikan Fas pada kelompok mencit yang tidak diinfeksi pada kelompok umur kebuntingan minggu pertama dan kedua tidak berbeda nyata tetapi kedua kelompok berbeda nyata dengan kelompok umur kebuntingan minggu ketiga. Pada kelompok mencit terinfeksi, persentase jumlah sel trofoblas yang mengekspresikan Fas pada kelompok umur kebuntingan minggu pertama berbeda nyata dengan kelompok umur kebuntingan minggu kedua dan ketiga, tetapi kelompok umur kebuntingan minggu kedua dan ketiga tidak berbeda nyata. Gambar 12 di bawah adalah sel trofoblas yang mengekspresikan Fas.

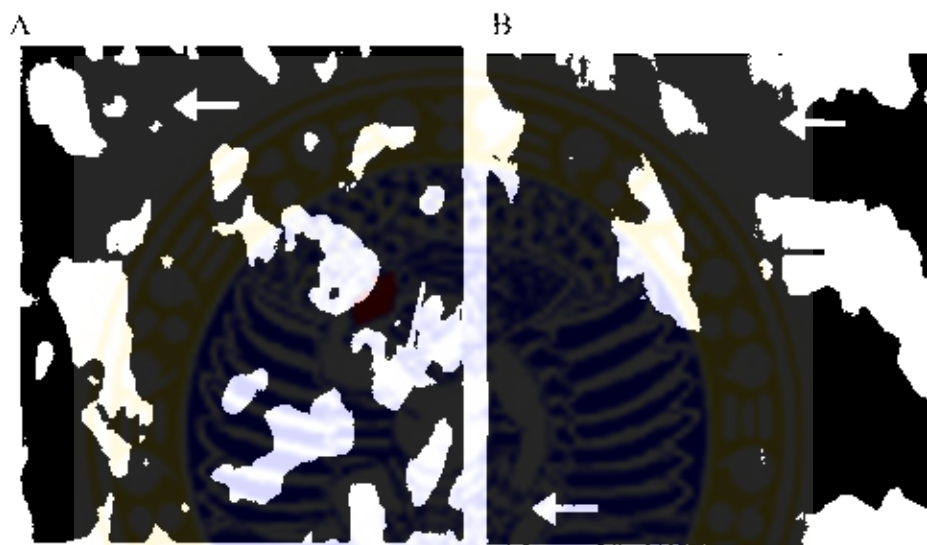


Gambar 12. Sel Trofoblas yang Mengekspresikan Fas. Pewarnaan imunohistokimia dengan antibodi poliklonal kelinci anti-Fas. A. Pembesaran 100x, B. Pembesaran 400x. Tanda panah merah (→) sel yang positif, tanda panah kuning (↘) sel yang negatif.

4. Persentase jumlah sel trofoblas yang mengekspresikan TNFR-1.

Persentase jumlah sel trofoblas yang mengekspresikan TNFR-1 pada mencit yang diinfeksi apabila dibandingkan dengan kelompok mencit yang tidak diinfeksi terlihat ada peningkatan, dari 12,7699 pada kelompok tidak diinfeksi menjadi 34,6046% pada kelompok mencit terinfeksi (Tabel 2). Secara rinci peningkatan tersebut dapat dilihat pada Tabel 3, adalah sebagai berikut: pada kelompok umur kebuntingan minggu pertama meningkat 3,4 kali (10,40% pada mencit tidak terinfeksi dan 35,01% pada mencit terinfeksi), pada minggu kedua meningkat 2,5 kali (13,94% pada mencit tidak terinfeksi dan 35,28% pada mencit terinfeksi) dan pada minggu ketiga meningkat 2,4 kali (13,97% pada mencit tidak terinfeksi dan 33,52% pada mencit terinfeksi). Umur

kebuntingan terlihat tidak berpengaruh pada ekspresi TNFR-1. Persentase jumlah sel trofoblas yang mengekspresikan TNFR-1 pada umur kebuntingan minggu pertama, kedua, dan ketiga tidak berbeda nyata, baik pada kelompok mencit terinfeksi maupun pada tidak terinfeksi. Gambar 13 di bawah adalah sel trofoblas yang mengekspresikan TNFR-1.



Gambar 13. Sel Trofoblas yang Mengekspresikan TNFR-1. Pewarnaan imunohistokimia dengan antibodi poliklonal kelinci anti-TNFR-1. Pembesaran 400x. A. Spongiotrofoblas B. Labyrinth, tanda panah merah (\rightarrow) sel yang positif, tanda panah kuning (\rightarrow) sel yang negatif.

5. Indeks apoptosis trofoblas:

Indeks apoptosis trofoblas pada mencit yang diinfeksi *T.gondii* apabila dibandingkan dengan kelompok yang tidak diinfeksi terlihat ada perbedaan yang nyata ($p < 0,05$) dan terjadi peningkatan yang tajam dari 17,3276% dari kelompok mencit tidak diinfeksi menjadi 49,1261% pada kelompok mencit diinfeksi (Tabel 2). Perbedaan secara rinci lihat Tabel 3. Pada mencit

kelompok umur kebuntingan minggu pertama indeks apoptosis trofoblas meningkat dari 9,33% menjadi 40.19% (4.3 kali), pada minggu kedua dari 10,19% menjadi 49,11% (4.8 kali), dan pada minggu ketiga dari 32.46% menjadi 50,08% (1,5 kali). Dari *post hoc test* (LSD), terlihat perbedaan pada tiap kelompok perlakuan. Baik pada kelompok mencit yang diinfeksi maupun yang tidak diinfeksi terlihat peningkatan indeks apoptosis sejalan dengan umur kebuntingan mencit dan perbedaan tersebut sangat nyata ($P < 0,01$), kecuali pada kelompok mencit tidak diinfeksi umur kebuntingan minggu pertama dan kedua secara statistik tidak berbeda nyata ($p > 0,05$). Gambar 14 di bawah adalah sel trofoblas yang mengalami apoptosis.



Gambar 14. Trofoblas Mencit Terinfeksi *T. gondii* yang Mengalami Apoptosis. Pewarnaan Apoptag Plus. Pembesaran 400x. Tanda panah merah (→) sel yang positif mengalami apoptosis, tanda panah kuning sel () yang negatif.

5.4 Pola Respons Inflamasi Plasenta Mencit Pengaruh Infeksi *T. gondii*

Untuk mengetahui pola respons inflamasi plasenta pengaruh infeksi *T. gondii* dilakukan analisis diskriminan pada setiap kelompok umur kebuntingan mencit. Dari hasil analisis diskriminan diperoleh variabel diskriminator atau variabel dominan, koefisien Fisher, dan besar kontribusi variabel dominan. Besar kontribusi variabel dominan merupakan perkalian koefisien Fisher dengan nilai rerata tiap variabel dominan. Besar kontribusi variabel dominan menunjukkan kontribusi variabel dominan terhadap kejadian respons inflamasi. Hasil analisis diskriminan dapat dilihat pada Lampiran 6. Secara rinci pola respons inflamasi plasenta mencit pengaruh infeksi *T. gondii* adalah sebagai berikut:

5.4.1 Pola respons inflamasi plasenta mencit terinfeksi *T. gondii* pada umur kebuntingan minggu pertama

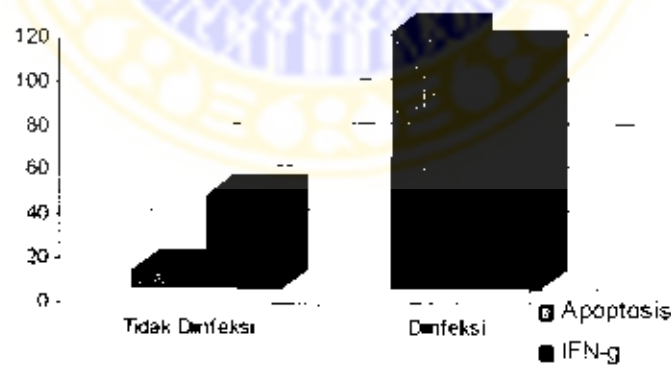
Dari lima variabel penentu respons inflamasi plasenta yang muncul sebagai variabel dominan pada analisis diskriminan adalah indeks apoptosis trofoblas dan persentase jumlah limfosit desidua yang menghasilkan IFN- γ (lihat Tabel 4 dan Gambar 15)

Dari Tabel 4 dan Gambar 15 terlihat bahwa besar kontribusi variabel dominan indeks apoptosis trofoblas pada kelompok mencit infeksi (116,68) lebih tinggi 14 kali bila dibanding dengan kelompok mencit yang tidak diinfeksi (8,35) dan besar kontribusi variabel dominan persentase jumlah limfosit desidua penghasil IFN- γ pada mencit terinfeksi (108,79) lebih tinggi 2,5 kali bila dibanding dengan mencit yang tidak diinfeksi (42,30). Hal ini menunjukkan kontribusi pada kejadian respons

inflamasi plasenta pada mencit yang terinfeksi *T. gondii* didominasi oleh variabel indeks apoptosis trofoblas dan diikuti persentase jumlah limfosit desidua penghasil IFN- γ .

Tabel 4. Hasil Analisis Diskriminan Respons Inflamasi Plasenta Mencit Terinfeksi *T. gondii* pada Umur Kebuntingan Minggu Pertama.

Nilai	Kelompok			
	Tidak Infeksi		Infeksi	
	Indeks Apoptosis Trofoblas	Persentase Limfosit Desidua Penghasil IFN- γ	Indeks Apoptosis Trofoblas	Persentase Limfosit Desidua Penghasil IFN- γ
Rata-rata	9,33	32,05	40,19	48,14
Koefisien Fisher	0,895	1,32	2,90	2,26
Besar kontribusi variabel dominan	8,35	42,30	116,68	108,79



Gambar 15. Pola Respons Inflamasi Plasenta Mencit Kebuntingan Terinfeksi *T. gondii* pada Umur Kebuntingan Minggu Pertama.

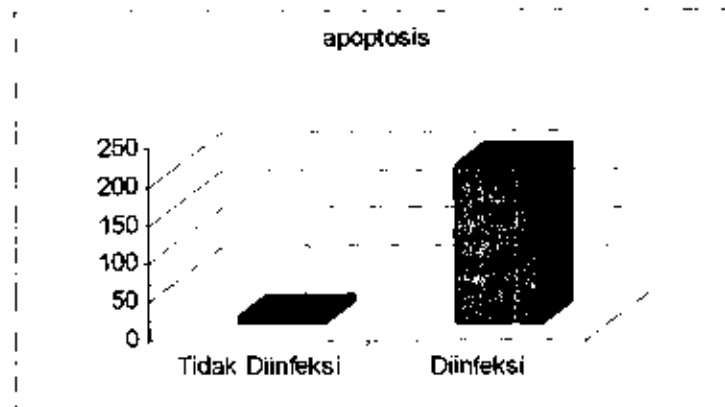
5.4.2 Pola respons inflamasi plasenta mencit terinfeksi *T. gondii* pada umur kebuntingan minggu kedua

Dari lima variabel penentu respons inflamasi plasenta yang muncul sebagai variabel dominan pada kelompok mencit umur kebuntingan minggu kedua hanya variabel indeks apoptosis trofoblas (lihat Tabel 5 dan Gambar 16).

Tabel 5. Hasil Analisis Diskriminan Respons Inflamasi Plasenta Mencit Terinfeksi *T. gondii* pada Umur Kebuntingan Minggu Kedua.

Nilai	Kelompok	
	Tidak Diinfeksi	Diinfeksi
	Indeks Apoptosis Trofoblas	Indeks Apoptosis Trofoblas
Rata-rata	10,19	49,10
Koefisien Fisher	0,87	4,19
Besar kontribusi variabel dominan	8,87	205,92

Tabel 5 di atas mencerminkan bahwa besar kontribusi variabel dominan indeks apoptosis trofoblas lebih tinggi (23 kali lipat) pada kelompok mencit infeksi (205,92) dibanding kelompok tidak diinfeksi (8,87). Hal ini menunjukkan kontribusi pada kejadian respons inflamasi plasenta pada mencit yang terinfeksi *T. gondii* didominasi oleh variabel indeks apoptosis trofoblas. Secara lebih jelas pola tersebut tergambar pada grafik batang di bawah ini (Gambar 16).



Gambar 16. Pola Respons Inflamasi Plasenta Mencit Terinfeksi *T. gondii* pada Umur Kebuntingan Minggu Kedua.

5.4.3 Pola respons inflamasi plasenta mencit terinfeksi *T. gondii* pada umur kebuntingan minggu ketiga

Dari lima variabel penentu respons inflamasi plasenta, yang muncul sebagai variabel dominan adalah persentase jumlah limfosit desidua yang menghasilkan IFN- γ dan persentase jumlah sel trofoblas yang mengekspresikan Fas (lihat Tabel 6. dan Gambar 17).

Dari Tabel 6, besar kontribusi variabel dominan persentase limfosit desidua penghasil IFN- γ tertinggi pada kelompok mencit infeksi, 147,4 (8 kali lipat dibanding dengan kelompok mencit tidak terinfeksi) dan diikuti besar kontribusi variabel dominan persentase jumlah sel trofoblas yang mengekspresikan Fas, 50,14. Hal ini menunjukkan kontribusi pada kejadian respons inflamasi plasenta pada mencit yang terinfeksi *T. gondii* didominasi oleh variabel persentase limfosit desidua penghasil IFN- γ dan diikuti persentase jumlah sel trofoblas yang mengekspresikan Fas. Secara lebih jelas pola tersebut terlihat pada gambar 17.

Tabel 6. Hasil Analisis Diskriminan Respons Inflamasi Plasenta Mencit Terinfeksi *T. gondii* pada Umur Kebuntingan Minggu Ketiga.

Nilai	Kelompok			
	Tidak Infeksi		Infeksi	
	Persentase Sel Desidua Penghasil IFN- γ	persentase jumlah sel trofoblas yang mengekspresikan Fas	Persentase Sel Desidua Penghasil IFN- γ	persentase jumlah sel trofoblas yang mengekspresikan Fas
Rata-rata	16,74	11,64	48,32	41,44
Koefisien Fisher	1,05	0,34	3,50	1,21
Besar kontribusi variabel dominan	17,65	4,00	147,45	50,14



Gambar 17. Pola Respons Inflamasi Plasenta Mencit Terinfeksi *T. gondii* pada Umur Kebuntingan Minggu Ketiga.

BAB 6

PEMBAHASAN

6.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental. *Randomized posttest only control group design* merupakan rancangan penelitian yang dipilih karena pengukuran awal tidak mungkin dilakukan. Pada saat pengambilan data mencit harus dikorbankan. Kelemahan dari rancangan ini adalah validitas eksternal diabaikan karena reaksi situasi pada saat dilakukan perlakuan tidak diketahui. Untuk mengatasi masalah tersebut dilakukan randomisasi.

6.2 Pengaruh Infeksi *Toxoplasma gondii* terhadap Respons Inflamasi Plasenta

Respons inflamasi plasenta ditentukan berdasarkan pengamatan perubahan persentase jumlah limfosit desidua penghasil IFN- γ , persentase jumlah makrofag desidua penghasil TNF- α , persentase jumlah sel trofoblas yang mengekspresikan Fas dan TNFR-1 serta indeks apoptotik sel trofoblas. Pada mencit yang diinfeksi terjadi peningkatan kelima variabel yang diukur yaitu peningkatan persentase jumlah limfosit desidua penghasil IFN- γ , peningkatan jumlah persentase makrofag desidua penghasil TNF- α , peningkatan persentase jumlah sel trofoblas yang mengekspresikan Fas dan peningkatan persentase jumlah sel trofoblas yang mengekspresikan TNFR-1 serta peningkatan indeks apoptotik sel trofoblas. Infeksi *T. gondii* menyebabkan perubahan respons inflamasi plasenta. Hal ini tercermin dari hasil analisis multivariat yang menunjukkan terdapat perbedaan yang bermakna antara kelompok mencit yang diinfeksi dan kelompok kontrol

(Nilai Wilks' Lamda = 0,060 dan $p = 0,00$). Setiap variabel yang diukur memberikan sumbangan perbedaan respons inflamasi plasenta. Hal ini ditunjukkan dengan hasil penghitungan yang tertera pada Tabel 2, yaitu setiap variabel berbeda antara mencit yang diinfeksi dengan yang tidak diinfeksi dengan nilai $p < 0,01$. Setelah dilakukan dengan uji LSD, terlihat perbedaan secara rinci pada tiap kelompok pengamatan, baik infeksi pada kebuntingan minggu pertama, kedua maupun ketiga. (dilihat Tabel 3 dan Gambar 8).

Peningkatan peresentase jumlah limfosit desidua yang memproduksi IFN- γ pada kelompok mencit infeksi menunjukkan bahwa infeksi *T. gondii* berpengaruh terhadap peningkatan aktivitas limfosit di desidua. Hasil pada penelitian ini mendukung pendapat Denkers dan Gazzinelli (1998) yang mengatakan bahwa *T. gondii* membangkitkan respons imun seluler lebih dominan yang ditandai dengan peningkatan produksi IFN- γ . Parasit menginduksi produksi IFN- γ dalam jumlah banyak baik pada infeksi akut maupun pada infeksi kronis. Hal ini juga menunjukkan bahwa respons imun seluler terhadap *T. gondii* juga terjadi di plasenta. Reaksi tersebut terjadi karena *T. gondii* merupakan parasit intraseluler obligat yang menginfeksi semua tipe sel, termasuk berbagai sel di uterus, kecuali eritrosit.

Menurut Denkers dan Gazzinelli (1998), pada awal infeksi, IFN- γ diproduksi oleh sel NK. Pada tahap ini, imunitas terhadap *T. gondii* terlihat tergantung pada makrofag dan sel NK. Ada 3 jalur alternatif sintesis IFN- γ . Pertama, infeksi *T. gondii* pada makrofag merangsang makrofag memproduksi IL-12, TNF- α , IL-1 β , dan IL-15. Sitokin IL-12, bersama-sama dengan IL-1 β , IL-15 dan TNF- α , merangsang sel NK untuk memproduksi IFN- γ . Sitokin IFN- γ yang

dihasilkan sel NK mengaktifkan makrofag TNF- α . Sitokin IFN- γ bekerja secara sinergis dengan TNF- α menginduksi ekspresi iNOS, yang menghasilkan NO untuk membunuh *T. gondii* intraseluler. Jalur kedua, infeksi *T. gondii* pada makrofag atau APC mendorong produksi IL-12. APC mempresentasi peptida parasit melalui MHC II sehingga dikenali oleh sel Th0 (sel T CD4⁺). Sel Th yang berikatan dengan MHC II memproduksi IL-2. Sitokin IL-2 dari sel Th dan IL-12 dari APC mendorong diferensiasi dari Th0 menjadi Th1. Sel Th1 menghasilkan IFN- γ . Jalur ketiga, makrofag atau APC yang terinfeksi mengekspresikan MHC I yang dikenali oleh sel T CTL (sel T sitotoksik atau sel T CD8⁺). Ikatan sel T CTL dengan APC melalui MHC I dan keberadaan IL-2 yang dihasilkan sel Th memicu sel T CTL menghasilkan IFN- γ .

Menurut Vince dan Johnson (2000), populasi leukosit pada desidua didominasi oleh makrofag, sel NK dan sel T CTL, juga sel Th meskipun dalam jumlah kecil. Jadi, semua komponen yang diperlukan untuk memproduksi IFN- γ ada pada desidua, sehingga apabila ada infeksi di desidua, limfosit di desidua teraktivasi untuk memproduksi IFN- γ . Jadi, peningkatan ekspresi IFN- γ pada penelitian ini juga menunjukkan bahwa infeksi *T. gondii* meningkatkan aktivitas limfosit di desidua. Menurut Olivares *et al.* (2002) limfosit desidua yang teraktivasi menyebabkan peningkatan apoptosis trofoblas. Selanjutnya dikatakan bahwa peningkatan apoptosis trofoblas berhubungan erat dengan peningkatan jumlah populasi limfosit T di desidua dan limfosit desidua yang teraktivasi bersifat sitotoksik terhadap trofoblas.

Desidua merupakan jaringan maternal yang paling dekat kontak dengan trofoblas fetus. Hubungan secara imunologis antara fetus dan maternal selama

et al., 2001; Phillips *et al.*, 2001). Interaksi TNF- α dengan TNFR-1 menyebabkan trimerisasi DD dari TNFR-1. TNFR-1 menarik protein adaptor TRADD. Protein TRADD akan menarik protein adaptor yang lain FADD. Protein FADD menarik procaspase-8 melalui interaksi protein DED. Procaspase-8 yang terikat pada FADD teraktivasi menjadi caspase-8. Caspase-8 mengaktifkan caspase efektor, caspase-3, 6, dan -7. Caspase efektor, terutama caspase-3 memecah sejumlah substrat antara lain PARP dan DFF sehingga terjadi fragmentasi DNA inti dan apoptosis. (Abbas *et al.*, 2000; Burrett *et al.*, 2001; Dumur *et al.*, 2001; Goldsby, 2000; Gupta, 2003; Sharif-Askari *et al.*, 2001). Ikatan TNF- α dengan TNFR-1 yang dimiliki trofoblas mengakibatkan trofoblas mengalami apoptosis.

Peranan TNF- α pada induksi apoptosis plasenta juga ditunjukkan pada infeksi *Human Cytomegalovirus* (HCMV) (Chan *et al.*, 2002; Zhu *et al.*, 1995), di mana HCMV adalah agen intraseluler sama seperti *T. gondii* dan menimbulkan infeksi kongenital seperti pada infeksi *T. gondii*. Peningkatan ekspresi TNF- α juga berhubungan dengan apoptosis trofoblas pada komplikasi kebuntingan IUGR dan pre eklamsia (DiFederico *et al.*, 1999; Smith *et al.*, 1997b).

Peningkatan ekspresi IFN- γ dan TNF- α pada penelitian ini juga sama dengan hasil yang ditunjukkan pada infeksi malaria. Menurut Fried *et al.* (1998), infeksi *Plasmodium falcifarum*, dapat meningkatkan kadar TNF- α , IFN- γ dan IL-2 pada plasenta dan perubahan ini berhubungan dengan hasil kebuntingan yang jelek berupa kehilangan fetus dan berat bayi lahir kecil. *P. falcifarum* adalah protozoa intraseluler obligat satu ordo dengan *T. gondii*.

Persentase jumlah limfosit desidua penghasil IFN- γ pada kelompok mencit yang tidak diinfeksi kelompok umur kebuntingan minggu pertama lebih tinggi

dibandingkan dengan kelompok umur kebuntingan minggu kedua dan ketiga. Hal ini karena pada kelompok mencit umur kebuntingan pertama pada saat mencit dikorbankan untuk pengambilan plasenta, proses perkembangan plasenta (plasentasi) masih berlangsung. Pada mencit, plasentasi sempurna pada umur kebuntingan 9-9,5 hari (Arvola, 2001, Clark *et al.*, 2001). Mencit pada kelompok minggu pertama, dikorbankan pada waktu kebuntingan berumur 8,5 hari (umur kebuntingan 4,5 hari diinfeksi dan 4 hari setelah infeksi mencit dikorbankan untuk pengambilan plasenta). Pada saat pembentukan plasentasi terjadi proses vaskularisasi dan IFN- γ sangat diperlukan untuk vaskularisasi. Pendapat ini dihubungkan dengan pendapat Ashkar *et al.* (2000) yang mengatakan bahwa limfosit yang dominan di tempat implantasi adalah sel NK dan sel NK adalah sumber IFN- γ yang diperlukan untuk vaskularisasi di desidua. Dominasi sel NK di tempat implantasi bersifat sementara, populasi mulai menurun setelah umur kebuntingan mencit 12 hari. Plasenta mencit pada kelompok mencit umur kebuntingan minggu kedua diambil pada saat umur kebuntingan mencit mencapai 13,5 hari dan pada kelompok mencit umur kebuntingan minggu ketiga plasenta diambil pada saat umur kebuntingan mencit mencapai 18,5 hari. Jadi, kemungkinan memang sudah terjadi penurunan sel NK sebagai sumber penghasil IFN- γ . Hal inilah yang kemungkinan menjadi penjelasan mengapa persentase jumlah limfosit desidua penghasil IFN- γ pada kebuntingan minggu kedua dan ketiga lebih sedikit dibanding minggu pertama.

Persentase jumlah makrofag desidua penghasil TNF- α pada mencit yang tidak diinfeksi pada kelompok kebuntingan minggu pertama lebih tinggi dari pada kelompok kebuntingan minggu kedua dan ketiga. Hasil ini sama dengan hasil

Hunt *et al* dalam Gorivodsky *et al.* (1998) yang menyatakan bahwa ekspresi TNF- α di plasenta sedikit sekali selama kebuntingan menciit, produksi mencapai puncak terjadi pada pertengahan kehamilan, kemudian menurun dan tetap stabil sampai akhir kebuntingan. Pada umur kebuntingan awal, TNF- α diperlukan untuk placentasi, diferensiasi blastosit dan trofoblas serta untuk invasi trofoblas (Gorivodsky *et al.*, 1998). Pada penelitian ini pada minggu pertama tinggi (23,99%), minggu kedua dan ketiga tidak berbeda nyata masing-masing 14,12% dan 10,64%.

Peningkatan ekspresi Fas di trofoblas pada infeksi *T. gondii* kemungkinan karena pengaruh peningkatan IFN- γ dan TNF- α di lingkungan mikro plasenta. Hal ini dihubungkan dengan pendapat yang mengatakan bahwa meskipun pada keadaan normal, trofoblas mengekspresikan Fas dalam kadar yang sangat rendah dan tahan terhadap apoptosis yang diperantarai Fas, tetapi keberadaan IFN- γ dan TNF- α memicu peningkatan ekspresi Fas dan meningkatkan kepekaan terhadap apoptosis yang diperantarai Fas (Aschkenazi *et al.*, 2002, Balkundi *et al.*, 2003; Mor dan Abrahams, 2003). Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa pada menciit yang tidak diinfeksi persentase ekspresi Fas sangat kecil baik pada kelompok menciit umur kebuntingan minggu pertama, kedua dan ketiga secara berturut-turut yaitu 3.65%, 5.37% dan 11.64%. Dari hasil tersebut terlihat bahwa secara fisiologis ekspresi Fas pada trofoblas meningkat sejalan dengan umur kebuntingan. Hasil tersebut sesuai dengan hasil penelitian Runic *et al.* (1998), yang melaporkan bahwa ekspresi Fas pada trofoblas plasenta *term* lebih tinggi dari pada *preterm* (umur 23-30 minggu atau trimester kedua). Dengan keberadaan IFN- γ dan TNF- α akibat infeksi *T. gondii* menyebabkan peningkatan ekspresi Fas

secara berturut-turut pada kelompok umur kebuntingan minggu pertama, kedua dan ketiga sebesar 27.11% (7,4 kali), 38.50% (7,2 kali) dan 41,44% (3,6 kali).

Interleukin-2 yang dihasilkan oleh sel Th1 karena rangsangan infeksi *T. gondii* diperkirakan mengaktifkan sel T CTL dan sel NK mengekspresikan Fas Ligan. Hal ini sesuai pendapat Goldsby *et al.* (2000) yang mengatakan sel T dan sel NK yang teraktivasi oleh IL-2 akan mengekspresikan Fas Ligan. Ikatan Fas Ligan sel T sitotoksik dan sel NK dengan Fas yang dimiliki oleh trofoblas memicu kejadian apoptosis trofoblas (Dumur *et al.*, 2001; Phillips *et al.*, 2001). Ikatan tersebut menarik adaptor protein FADD, melalui DD dari Fas dan DD dari FADD. FADD juga mempunyai DED dan melalui DED ini FADD menarik dan berinteraksi dengan procaspase-8. Procaspase-8 yang terikat oleh FADD teraktivasi menjadi caspase-8 yang aktif. Caspase-8 dapat memecah sejumlah procaspase efektor seperti procaspase-3 menjadi caspase efektor yang aktif sehingga mampu memecah dan mengaktivasi sejumlah substrat diantaranya PARP dan DFF yang menyebabkan fragmentasi DNA inti sel sehingga terjadi apoptosis. (Abbas *et al.*, 2000; Ashkenazi dan Dixit, 1998; Burrett *et al.*, 2001; Gupta, 2003; Reed, 2000; Sharif-Askari *et al.*, 2001; Wolf dan Green, 1999).

Peningkatan ekspresi Fas di trofoblas, peningkatan kepekaan trofoblas terhadap apoptosis yang diperantarai Fas serta peningkatan Fas Ligan akibat peningkatan IL-2 pada infeksi *T. gondii* ini menjadi penjelasan, mengapa pada indeks apoptosis trofoblas pada kelompok mencit yang diinfeksi lebih tinggi dibanding dengan kelompok mencit yang tidak diinfeksi. Peningkatan ekspresi Fas pada trofoblas juga terjadi pada kasus korioamnionitis pada wanita hamil dan peningkatan ekspresi Fas tersebut berhubungan dengan peningkatan apoptosis

trofoblas (Balkundi *et al.*, 2003). Menurut Balkundi *et al.* (2003), ekspresi Fas Ligan baik pada trofoblas dan limfosit maternal (desidua) yang teraktivasi dapat memicu apoptosis trofoblas yang diperantarai Fas dan peningkatan ekspresi Fas pada trofoblas menyebabkan trofoblas peka terhadap apoptosis yang diperantarai Fas.

Peningkatan ekspresi TNFR-1 di trofoblas pada infeksi *T. gondii* kemungkinan hanya merupakan konsekuensi dari peningkatan ekspresi TNF- α di desidua. Peningkatan TNFR-1 juga terjadi pada infeksi *T. gondii* pada penelitian tingkat *in vitro*. Infeksi *T. gondii* pada sel kultur fibroblas memicu peningkatan ekspresi TNFR-1, tetapi peningkatan reseptor ini berhubungan dengan resistensi sel terinfeksi terhadap apoptosis (Derouich-Guergour *et al.*, 2002; Molestina *et al.*, 2003). Sitokin TNF- α merupakan sitokin yang berperan pada inflamasi, imunitas, respons antiviral dan berbagai penyakit. Sitokin TNF- α mengaktifkan berbagai komponen yang bertanggung jawab pada transduksi sinyal sel (Osawa *et al.*, 2002). Sitokin TNF- α sebagai ligan mempunyai reseptor TNFR-1 (p55) dan TNFR-2 (p75) (Abbas *et al.*, 2000). TNFR-1 mempunyai dua aktivitas biologis yang saling berbeda yaitu memberikan sinyal apoptotik dan sinyal tetap hidup (*survival signal transduction*). Ikatan antara TNF- α dengan reseptor TNFR-1 menyebabkan penarikan protein intraseluler yang terlibat dalam transduksi sinyal apoptotik dan tetap hidup (Abbas *et al.*, 2000; Dumur *et al.*, 2001; Gupta, 2003). Kontribusi peningkatan TNFR-1 di trofoblas terhadap kejadian inflamasi plasenta akibat infeksi *T. gondii* pada penelitian ini kecil, hal ini terlihat pada analisis diskriminan, variabel ini tidak muncul sebagai variabel dominan. Meskipun peranan TNFR-1 terhadap inflamasi plasenta kecil, peningkatan TNFR-1 pada

lingkungan mikro plasenta perlu diwaspadai, hal ini terkait dengan penelitian Gorivodsky *et al.* (1998) yang melaporkan bahwa peningkatan TNFR-1 pada plasenta berhubungan dengan kehilangan kebuntingan mencit. Peningkatan TNFR-1 ini berhubungan dengan peningkatan ekspresi TNF- α pada plasenta mencit yang mengalami abortus spontan. Keterlibatan peningkatan ekspresi TNFR-1 pada kejadian apoptosis akibat pada infeksi *T. gondii* ditunjukkan oleh Deckert-Schlüter *et al.* (1998) dan Mordue *et al.* (2001). Mereka melaporkan bahwa apoptosis sel imun di intracerebral dan sel limpa tergantung pada ekspresi TNFR-1.

Jadi, peningkatan indeks apoptosis trofoblas pada infeksi *T. gondii* pada penelitian ini terkait dengan peningkatan variabel lain yaitu persentase jumlah limfosit desidua penghasil IFN- γ , persentase jumlah makrofag desidua penghasil TNF- α , persentase jumlah sel trofoblas yang mengekspresikan Fas dan peningkatan persentase jumlah sel trofoblas yang mengekspresikan TNFR-1. Apoptosis trofoblas dapat dipicu oleh berbagai rangsangan yang terlibat pada *signaling cascade* (Dumur *et al.*, 2001), antara lain diperantarai oleh sitokin Th1 (Aschkenazi *et al.*, 2002). Jadi, peningkatan apoptosis trofoblas akibat infeksi *T. gondii* pada penelitian ini disebabkan karena terjadi peningkatan ekspresi IFN- γ dan TNF- α di desidua serta peningkatan ekspresi Fas dan TNFR-1 di trofoblas. Peningkatan apoptosis trofoblas merupakan keadaan patologis dan merupakan ciri dari penolakan trofoblas sehingga dapat menyebabkan komplikasi kebuntingan, berupa abortus, lahir mati dan berat lahir ringan (Aschkenazi *et al.*, 2002; Smith *et al.*, 1997).

Indeks apoptosis pada kelompok mencit terinfeksi pada umur kebuntingan minggu ketiga sangat berbeda nyata dengan kelompok umur kebuntingan minggu kedua dan pertama. Penjelasan untuk hal tersebut kemungkinan karena pada kebuntingan yang lebih muda terjadi penggantian sel trofoblas yang telah mati dengan sel baru. Hal ini didasarkan pada pendapat Payne *et al.* (1999) yang mengatakan bahwa villi plasenta terdiri dari sitotrofoblas muda, sitotrofoblas yang selalu memperbanyak diri dan sitotrofoblas berinti satu. Sitotrofoblas adalah prekursor dari semua trofoblas. Jumlah trofoblas pada villous plasenta tersebut tertinggi pada umur kebuntingan trimester pertama, diikuti pada trimester kedua dan semakin berkurang pada trimester ketiga. Indeks apoptosis dihitung berdasarkan jumlah inti sel yang apoptotik dibagi jumlah inti semua sel dalam pengamatan dikalikan 100% (Runic *et al.*, 1998). Karena pembagi jauh lebih sedikit maka hasil perhitungan pada kebuntingan minggu ketiga terlihat indeks apoptosis lebih tinggi dari yang minggu kedua dan pertama. Dari hasil tersebut juga dapat disimpulkan bahwa infeksi pada umur kebuntingan yang lebih lanjut mempunyai resiko terjadi apoptosis trofoblas lebih tinggi dibandingkan dengan infeksi pada umur kebuntingan lebih muda. Resiko tersebut akan membawa dampak pada fetus yang dikandung.

Apoptosis trofoblas juga terjadi pada kelompok mencit yang tidak diinfeksi dan terjadi peningkatan indeks apoptosis trofoblas sejalan dengan peningkatan umur kebuntingan. Peningkatan indeks apoptosis trofoblas menjadi sangat nyata pada umur kebuntingan minggu ketiga. Hasil ini sesuai dengan pernyataan Mor dan Abrahams (2003) dan Smith *et al.* (1997a), bahwa pengaturan apoptosis plasenta penting untuk kebuntingan normal secara fisiologis. Selama implantasi,

apoptosis penting untuk *remodelling* jaringan desidua maternal dan invasi trofoblas. Selanjutnya dikatakan bahwa pada kebuntingan normal, apoptosis terjadi sejalan dengan umur kebuntingan. Kejadian apoptosis trofoblas lebih tinggi pada kebuntingan trimester ketiga dibanding dengan trimester pertama. Penelitian ini juga membuktikan bahwa indeks apoptosis trofoblas pada kelompok mencit tidak diinfeksi, tertinggi pada kelompok umur kebuntingan minggu ketiga. Kenyataan ini juga memperkuat penjelasan kejadian peningkatan indeks apoptosis yang sangat nyata pada mencit terinfeksi *T. gondii* pada umur kebuntingan minggu ketiga, dibanding kelompok mencit terinfeksi pada umur kebuntingan minggu kedua dan pertama.

6.3 Pola Respons inflamasi Plasenta Mencit Pengaruh Infeksi *T. gondii*

Setelah diketahui bahwa infeksi *T. gondii* menyebabkan perubahan respons inflamasi plasenta, baik infeksi pada kebuntingan minggu pertama, kedua maupun ketiga, analisis dilanjutkan dengan analisis diskriminan. Dengan analisis ini dapat diketahui variabel pembeda dominan (diskriminator) dan besar kontribusi variabel dominan terhadap respons inflamasi plasenta akibat infeksi *T. gondii*. Besar kontribusi variabel dominan diperlukan untuk membangun pola respons inflamasi plasenta yang mencerminkan kontribusi fungsi setiap variabel dominan pada proses respons inflamasi. Pola respons inflamasi dibentuk berdasarkan besar kontribusi variabel dominan yang diperoleh dengan mengkalikan nilai koefisien Fisher (dari analisis diskriminan) dengan nilai rerata masing-masing variabel dominan. Besar kontribusi variabel dominan menggambarkan besar kontribusi variabel dominan terhadap respons inflamasi plasenta.

Dari penentuan pola respons inflamasi plasenta diperoleh tiga pola yang berbeda berkaitan dengan umur kebuntingan mencit saat mendapatkan infeksi *T. gondii* (lihat Tabel 4, 5, 6 dan Gambar 15, 16, 17).

6.3.1 Pola respons inflamasi plasenta mencit terinfeksi *Toxoplasma gondii* pada umur kebuntingan minggu pertama

Setelah dilakukan analisis diskriminan, ternyata respons inflamasi plasenta akibat infeksi *T. gondii* pada kebuntingan minggu pertama didominasi peningkatan indeks apoptosis trofoblas dan persentase jumlah limfosit desidua penghasil IFN- γ . Pada kelompok ini, variabel indeks apoptosis trofoblas dan persentase jumlah limfosit desidua penghasil IFN- γ muncul sebagai variabel dominan. Nilai koefisien Fisher indeks apoptosis trofoblas 2,90 pada kelompok infeksi dan 0,89 pada kelompok tidak diinfeksi. Setelah nilai rerata dikalikan dengan koefisien Fisher, diperoleh hasil besar kontribusi variabel dominan indeks apoptosis trofoblas pada mencit bunting minggu pertama yang diinfeksi *T. gondii* (116,68), empat belas kali lebih besar dari kelompok mencit yang tidak diinfeksi (8,35) (lihat Gambar 14).

Kontribusi fungsi indeks apoptosis trofoblas yang besar ini menunjukkan bahwa pada kasus infeksi *T. gondii* pada kebuntingan minggu pertama rentan untuk terjadi apoptosis trofoblas. Di atas, dijelaskan bahwa peningkatan apoptosis trofoblas merupakan keadaan patologis dan merupakan ciri dari penolakan trofoblas yang berakibat pada komplikasi kebuntingan, antara lain abortus (Aschkenazi *et al.*, 2002; Smith *et al.*, 1997). Hal inilah yang kemungkinan

6.3.2 Pola respons inflamasi plasenta mencit terinfeksi *Toxoplasma gondii* pada umur kebuntingan minggu kedua

Dari analisis diskriminan pada kelompok mencit umur kebuntingan minggu kedua diperoleh variabel dominan indeks apoptosis trofoblas dengan koefisien Fisher 0,87 untuk kelompok mencit tidak diinfeksi dan 4,103 untuk kelompok mencit diinfeksi. Setelah dikalikan dengan nilai rerata setiap kelompok, diperoleh besar kontribusi variabel dominan untuk mencit tidak terinfeksi 8,87 dan untuk kelompok mencit terinfeksi 205,92. Dari perhitungan tersebut dapat diartikan bahwa besar kontribusi indeks apoptosis trofoblas terhadap respons inflamasi plasenta pada mencit yang diinfeksi *T. gondii*, 23 kali lebih tinggi dibanding dengan mencit yang tidak diinfeksi. Hal inilah yang kemungkinan juga menjadi alasan mengapa pada infeksi *T. gondii* pada kebuntingan trimester kedua juga terjadi resiko abortus spontan.

Pola ini berbeda dengan pola respons inflamasi mencit terinfeksi pada umur kebuntingan minggu pertama. Pada pola ini persentase jumlah sel desidua penghasil IFN- γ tidak muncul sebagai variabel dominan. Perbedaan tersebut kemungkinan karena sel sumber IFN- γ di desidua pada mencit bunting umur minggu pertama lebih banyak dari pada mencit bunting minggu kedua. Hal ini dihubungkan dengan pendapat Ashkar *et al.* (2000) yang menyatakan bahwa dominasi sel NK di tempat implantasi bersifat sementara, populasi mulai menurun setelah umur kebuntingan mencit 12 hari. Pada penelitian ini, plasenta mencit pada kelompok umur kebuntingan minggu kedua diambil pada saat umur kebuntingan mencit mencapai 13,5 hari. Jadi, kemungkinan memang sudah terjadi penurunan sel NK sebagai sumber penghasil IFN- γ , sehingga pada pengamatan terlihat ada penurunan persentase jumlah sel penghasil IFN- γ bila dibanding

dengan kelompok mencit umur kebuntingan minggu pertama (48,136% pada kebuntingan minggu pertama dan 39,321% pada kebuntingan minggu kedua). Penurunan persentase jumlah sel penghasil IFN- γ juga disebabkan kadar hormon steroid pada umur kebuntingan kedua mulai meningkat, hal ini berakibat pada penekanan produksi IFN- γ . Pada saat individu bunting, hormon progesteron dan estrogen menyebabkan penurunan jumlah, aktivitas dan toksisitas sel NK dan sel T (Dosiou dan Giudice 2005, Kawana *et al.*, 2005). Kedua alasan penurunan jumlah sel penghasil IFN- γ tersebut kemungkinan yang menyebabkan variabel persentase jumlah limfosit desidua penghasil IFN- γ tidak muncul sebagai variabel dominan. Penurunan tersebut juga menyebabkan perbedaan pola respons inflamasi plasenta mencit akibat infeksi *T. gondii* pada saat umur kebuntingan minggu kedua.

6.3.3 Pola respons inflamasi plasenta mencit terinfeksi *Taxoplasma gondii* pada umur kebuntingan minggu ketiga

Pola respons inflamasi plasenta mencit karena pengaruh infeksi pada umur kebuntingan minggu ketiga menunjukkan perbedaan dengan kelompok umur kebuntingan minggu pertama dan kedua. Pada kelompok umur kebuntingan minggu ketiga, respons inflamasi plasenta mencit akibat infeksi *T. gondii* didominasi oleh peningkatan IFN- γ dan Fas. Hal ini terlihat pada analisis diskriminan yang muncul sebagai variabel dominan adalah persentase jumlah limfosit desidua penghasil IFN- γ dan persentase jumlah sel trofoblas yang mengekspresikan Fas. Koefisien Fisher persentase jumlah sel desidua penghasil IFN- γ 1,05 untuk mencit tidak diinfeksi dan 3,05 untuk mencit yang diinfeksi,

sedangkan koefisien Fisher persentase sel trofoblas yang mengekspresikan Fas 0,344 untuk mencit tidak diinfeksi dan 1,21 untuk mencit yang diinfeksi. Kontribusi tertinggi terhadap kejadian inflamasi plasenta mencit akibat infeksi *T. gondii* pada kelompok umur kebuntingan minggu ketiga ditempati oleh variabel persentase jumlah limfosit desidua penghasil IFN- γ dengan besar kontribusi variabel dominan 147,45 (8 kali dari kelompok mencit yang tidak diinfeksi yaitu 17,65) dan diikuti persentase jumlah sel trofoblas yang mengekspresikan Fas dengan besar kontribusi variabel dominan 50,14 (12,5 kali dari kelompok yang tidak diinfeksi yaitu 4,00).

Fas sebagai variabel dominan yang muncul pada kelompok umur ini kemungkinan karena faktor umur. Runic *et al.* (1998) mengatakan bahwa pada manusia, ekspresi Fas pada plasenta cenderung meningkat pada kehamilan trimester ketiga dibandingkan dengan trimester pertama dan ekspresi Fas ini berhubungan dengan apoptosis plasenta. Apoptosis pada kebuntingan trimester ketiga merupakan proses fisiologis. Selanjutnya dikatakan bahwa peningkatan ekspresi Fas pada plasenta menunjukkan peranan *signaling* Fas pada apoptosis dan *remodelling* membran fetus. Ekspresi Fas yang dimaksudkan untuk proses fisiologis, dengan peningkatan IFN- γ akibat induksi *T. gondii* menyebabkan peningkatan ekspresi Fas pada plasenta mencit terinfeksi (peningkatan sampai lebih dari 3,5 kali, dari 11,64% pada kelompok tidak terinfeksi menjadi 41,44% pada mencit terinfeksi).

Reaksi peningkatan ekspresi Fas di trofoblas yang berkontribusi terhadap respons inflamasi plasenta akibat infeksi *T. gondii* ini hampir sama dengan penelitian Ejima *et al.* (2000) yang membuat model inflamasi plasenta dengan

menginjeksikan LPS pada mencit umur kebuntingan 13 hari Pemberian LPS mengakibatkan terjadi apoptosis plasenta dan peningkatan ekspresi Fas serta FasL. Peningkatan ekspresi Fas pada trofoblas dan spongiotrofoblas akibat LPS tersebut berhubungan dengan kejadian apoptosis plasenta.

Indeks apoptosis trofoblas pada kelompok mencit umur kebuntingan minggu ketiga tidak muncul sebagai variabel yang dominan kemungkinan karena pengaruh faktor umur kebuntingan. Pada umur kebuntingan minggu ketiga, secara fisiologis, juga terjadi peningkatan indeks apoptosis yang tinggi. Hal tersebut dihubungkan dengan pendapat Smith *et al.* (1997a) yang mengatakan bahwa apoptosis trofoblas terjadi pada kebuntingan normal sejalan dengan umur kebuntingan, secara signifikan apoptosis trofoblas tertinggi terjadi pada umur kebuntingan trimester ketiga dan terendah trimester pertama. Sehingga meskipun secara perhitungan pada hasil pengamatan dan analisis statistik menunjukkan perbedaan antara kelompok infeksi dan yang tidak diinfeksi, tetapi karena perbedaan tersebut lebih rendah bila dibanding dengan variabel lain (IFN- γ dan Fas) maka pada uji diskriminan variabel indeks apoptosis tidak muncul. Selain itu mungkin karena faktor hormonal. Dijelaskan di atas hormon steroid menekan sel Th1. Salah satu produk dari Th1 adalah IL-2 sehingga dengan keberadaan hormon tersebut dalam kadar tinggi, menekan produksi IL-2 dan ekspresi Fas Ligan terhambat. Jadi meskipun infeksi *T. gondii* pada minggu ketiga, Fas muncul sebagai variabel dominan tetapi karena ekspresi Fas Ligan tidak sebanding dengan ekspresi Fas maka mempengaruhi indeks apoptosis trofoblas sebagai variabel dominan.

Perbedaan pola respons inflamasi plasenta akibat infeksi *T. gondii* pada minggu pertama, kedua dan ketiga ini kemungkinan pengaruh hormon kebuntingan. Selama kebuntingan terutama hormon estrogen dan progesteron meningkat. Hal ini membawa dampak pada sistem imun. Secara fisiologis perubahan tersebut dimaksudkan untuk melindungi fetus dari respons imun maternal. Progesteron dan estrogen menekan aktivitas dan jumlah sel NK, menghambat aktivitas, diferensiasi dan proliferasi sel Th1 serta mengaktifkan sel Th2. Di bawah pengaruh progesteron limfosit memproduksi protein PIBF. Protein PIBF memodulasi aktivitas sel NK dengan cara menurunkan aktivitas sel NK. Sel NK merupakan mediator seluler yang penting pada pertahanan alami terhadap berbagai patogen. Prinsip mekanisme efektor sel NK antara lain melisis sel terinfeksi dan memproduksi IFN- γ . Produksi IFN- γ oleh sel NK penting pada infeksi parasit intraseluler karena memicu perkembangan respons adaptif tipe Th1. Protein PIBF juga menghambat produksi IL-12 yang dipergunakan untuk aktivasi sel NK dan diferensiasi sel Th ke arah Th1 untuk memproduksi IFN- γ . Sebaliknya PIBF meningkatkan produksi IL-10 sehingga diferensiasi sel Th ke arah Th2. Sitokin IL-10 menghambat sel Th1 memproduksi IFN- γ . (Abbas *et al.*, 2000, Dosiou dan Giudice 2005; Kawana *et al.*, 2005; Piccinni *et al.* 2001, Roberts *et al.*, 2001).

Progesteron dan estrogen dihasilkan oleh *corpus luteum* dan plasenta. Pada awal kebuntingan produksi progesteron dalam jumlah sedikit dan meningkat sejalan dengan umur kebuntingan, tetapi mendekati waktu kelahiran kadar progesteron menurun sedangkan estrogen tetap tinggi (Peltier, 2003; Bekerman dan Dudley, 2001, Monk, 1987). Karena hormon kebuntingan tersebut

mempengaruhi aktivitas sel yang berperan pada respons inflamasi plasenta maka perubahan kadar hormon akibat penambahan umur kebuntingan mempengaruhi perubahan respons inflamasi plasenta pada tiap kelompok umur kebuntingan mencit terinfeksi.

Uraian di atas juga dapat dijadikan penjelasan mengapa pada penelitian ini persentase jumlah limfosit desidua penghasil IFN- γ pada kelompok mencit terinfeksi minggu pertama lebih tinggi dari pada minggu kedua dan tidak berbeda nyata dengan kelompok kebuntingan minggu ketiga. Karena kadar progesteron plasenta kelompok mencit yang diinfeksi pada umur kebuntingan minggu pertama lebih sedikit dari pada kelompok mencit terinfeksi minggu kedua dan hormon progesteron menekan produksi IFN- γ maka ekspresi IFN- γ pada desidua kelompok mencit terinfeksi minggu kedua lebih sedikit dari pada minggu pertama. Plasenta mencit terinfeksi pada kelompok umur kebuntingan minggu ketiga diambil pada saat umur kebuntingan mencit 18,5 hari. Lama umur kebuntingan mencit adalah 19-20 hari (Medicine ucsd.edu. 2002; Monk, 1987). Diperkirakan progesteron pada mencit terinfeksi pada umur kebuntingan minggu ketiga sudah menurun (mendekati kelahiran), akibat penurunan kadar hormon tersebut menyebabkan produksi IFN- γ meningkat

6.4 Mekanisme Apoptosis Trofoblas Pada Mencit yang Terinfeksi *T. gondii*

Tiga pola respons inflamasi plasenta yang diperoleh dari analisis diskriminan tersebut mendasari peningkatan apoptosis trofoblas. Jadi, dari ketiga pola tersebut juga dapat diartikan bahwa mekanisme apoptosis trofoblas akibat

infeksi *T. gondii* berbeda pada setiap kelompok umur kebuntingan mencit saat mendapatkan infeksi:

1. Pola respons inflamasi plasenta mencit terinfeksi pada umur kebuntingan minggu pertama didominasi variabel indeks apoptosis dan persentase jumlah limfosit desidua penghasil IFN- γ . Jadi mekanisme apoptosis trofoblas karena infeksi pada umur kebuntingan minggu pertama melalui peningkatan persentase jumlah limfosit desidua penghasil IFN- γ
2. Pola respons inflamasi plasenta mencit terinfeksi pada umur kebuntingan minggu kedua hanya didominasi oleh variabel indeks apoptosis. Jadi mekanisme apoptosis trofoblas pada infeksi *T. gondii* pada umur kebuntingan minggu kedua terjadi melalui semua jalur yaitu peningkatan persentase jumlah limfosit desidua penghasil IFN- γ , persentase jumlah makrofag desidua penghasil TNF- α , persentase jumlah trofoblas yang mengekspresikan Fas dan persentase jumlah trofoblas yang mengekspresikan TNFR-1 atau bahkan mungkin jalur lain yang tidak diamati pada penelitian ini.
3. Pola respons inflamasi plasenta mencit terinfeksi pada umur kebuntingan minggu ketiga didominasi persentase jumlah limfosit desidua penghasil IFN- γ dan persentase jumlah trofoblas yang mengekspresikan Fas. Dari pola ini dapat disimpulkan mekanisme apoptosis trofoblas karena infeksi *T. gondii* pada umur kebuntingan minggu ketiga melalui jalur peningkatan persentase

jumlah limfosit desidua penghasil IFN- γ dan persentase jumlah trofoblas yang mengekspresikan Fas.

Meskipun pola respons inflamasi plasenta akibat infeksi *T. gondii* dan mekanisme apoptosis trofoblas tersebut berbeda berdasarkan umur kebuntingan mencit saat mendapatkan infeksi, tetapi ada persamaan yang dapat ditarik yaitu: pertama bahwa persentase jumlah limfosit desidua penghasil IFN- γ selalu muncul sebagai variabel dominan dengan besar kontribusi cukup tinggi pada hampir setiap kelompok umur kebuntingan. Kedua, persentase jumlah trofoblas yang mengekspresikan Fas hanya muncul sebagai variabel dominan pada infeksi minggu ketiga, namun demikian pada infeksi minggu kedua variabel tersebut juga merupakan jalur mekanisme peningkatan apoptosis trofoblas. Pada minggu pertama ekspresi Fas tidak muncul sebagai variabel dominan dan tidak merupakan jalur mekanisme peningkatan apoptosis, tetapi kalau dicermati perbedaan antara mencit yang diinfeksi dengan yang tidak diinfeksi pada minggu pertama cukup tinggi (lihat Tabel 3).

Persamaan tersebut di atas memberikan kesimpulan bahwa kenaikan peningkatan indeks apoptosis trofoblas selalu diikuti dengan peningkatan persentase jumlah limfosit desidua yang menghasilkan IFN- γ dan persentase jumlah trofoblas yang mengekspresikan Fas. Hal ini juga tercermin pada Tabel 2, variabel indeks apoptosis trofoblas mempunyai nilai F tertinggi ($F=371,775$), diikuti persentase jumlah limfosit desidua penghasil IFN- γ ($F=184,615$) dan persentase trofoblas yang mengekspresikan Fas ($F=120,135$). Jadi dapat disimpulkan bahwa mekanisme apoptosis trofoblas akibat infeksi *T. gondii* melalui peningkatan ekspresi IFN- γ di desidua dan peningkatan ekspresi Fas di

trofoblas. Hasil ini sesuai dengan pendapat Olivares *et al.* (2002) limfosit desidua yang teraktivasi mengakibatkan apoptosis trofoblas. Pendapat Aschenascazi *et al.* (2002) dan Balkundi *et al.* (2003) bahwa peningkatan IFN- γ di lingkungan mikro plasenta memicu peningkatan Fas pada trofoblas dan meningkatkan kepekaan apoptosis melalui Fas sehingga menyebabkan peningkatan apoptosis trofoblas. Dalam penelitian ini infeksi *T. gondii* mengaktifkan limfosit desidua, ditunjukkan dengan peningkatan persentase jumlah limfosit desidua yang menghasilkan IFN- γ sehingga terjadi peningkatan Fas dan apoptosis trofoblas.

Menurut Olivares *et al.* (2002) limfosit desidua selalu cenderung mematikan trofoblas, meskipun pada kondisi kebuntingan normal aktivitas tersebut dihambat. Selanjutnya dikatakan bahwa aktivitas imun maternal melawan trofoblas merupakan mekanisme biologis yang efisien untuk mengeliminasi fetus sewaktu terjadi masalah kebuntingan dan hanya akan dipilih fetus yang normal untuk dikembangkan. Pernyataan tersebut dapat diasumsikan bahwa respons inflamasi pada plasenta mencit yang terinfeksi *T. gondii* yang ditandai oleh peningkatan ekspresi IFN- γ , TNF- α , Fas, TNFR-1 dan apoptosis trofoblas yang terlihat pada setiap umur kebuntingan merupakan upaya maternal untuk membatasi penyebaran infeksi pada anak. Pembatasan penyebaran infeksi pada anak tersebut ditunjukkan dengan cara akibat yang ditimbulkan pada infeksi *T. gondii* yaitu abortus. Asumsi tersebut didasarkan pada kenyataan bahwa pada infeksi yang beresiko abortus cukup tinggi, angka penularan rendah. Pada infeksi *T. gondii* resiko abortus dan angka penularan tergantung umur kebuntingan saat mendapatkan infeksi. Infeksi *T. gondii* pada umur kebuntingan trimester pertama, angka penularan 17% dengan resiko abortus spontan, infeksi trimester kedua angka penularan 25% dengan

resiko abortus spontan atau fetus terinfeksi berat dan infeksi pada kebuntingan trimester ketiga angka penularannya 65% dengan resiko fetus terinfeksi ringan (*Pediatric Database*, 1994)

Meskipun telah ada usaha untuk mengeliminasi fetus sewaktu terjadi infeksi *T. gondii*, pada kenyataannya masih ada fetus yang terlahir dengan kemungkinan penularan yang semakin meningkat pada infeksi trimester ketiga dan bahkan pada infeksi trimester ketiga tidak terjadi resiko abortus. Hal ini kemungkinan karena ada peranan hormon kebuntingan, khususnya hormon progesteron. Hormon progesteron menyebabkan reaksi imun maternal bias ke arah Th2, yang menguntungkan bagi parasit untuk berkembang biak dan hidup lebih lama. Pada kebuntingan trimester pertama kadar progesteron rendah sehingga bias ke Th2 kecil. Jadi, apabila terjadi infeksi pada trimester pertama dan kedua maka angka penularan ke fetus kecil, tetapi frekuensi kejadian apoptosis trofoblas tinggi sehingga mengakibatkan resiko abortus tinggi. Hal ini juga dibuktikan pada penelitian ini, indeks apoptosis muncul sebagai variabel dominan pada respons inflamasi plasenta. Sebaliknya, infeksi pada trimester ketiga, di mana kadar progesteron meningkat maka frekuensi penularan kongenital lebih tinggi. Kadar yang tinggi menyebabkan terjadi bias ke arah Th2 lebih kuat dan resiko peningkatan apoptosis trofoblas lebih kecil sehingga tidak mampu mengakibatkan terjadi induksi abortus. Pada hasil penelitian ini terlihat peningkatan indeks apoptosis trofoblas pada mencit terinfeksi minggu ketiga 1,5 kali, lebih rendah dari pada kelompok infeksi minggu pertama dan kedua (masing-masing 4,3 kali dan 4,8 kali). Ada kemungkinan bahwa respons Th1 akibat infeksi *T. gondii* pada kebuntingan awal lebih kuat sehingga resiko bagi fetus lebih berat, yaitu abortus. Sebaliknya pada

periode kebuntingan lanjut, bias ke arah Th2 lebih kuat dari pada ke arah Th1. Sitokin Th2 berfungsi untuk mempertahankan kebuntingan, tetapi sitokin Th2 menekan fungsi sel NK, makrofag dan sel T CD8⁺ (CTL) sehingga memungkinkan parasit tahan hidup lebih lama dan memperbanyak diri serta meningkatkan kemungkinan penularan transplasental. (Piccinni *et al.*, 2001; Roberts *et al.*, 2001; Thouvenin *et al.*, 1997). Bukti bahwa kemungkinan pengaruh hormon kebuntingan yang berperan pada angka penularan juga ditunjukkan pada hasil perhitungan jumlah takizoit yang tinggi pada infeksi pada kebuntingan minggu ketiga dibanding minggu kedua dan pertama. Jumlah takizoit *T. gondii* dalam cairan peritoneal mencit yang diinfeksi pada umur kebuntingan minggu ketiga lebih banyak ($5,98 \times 10^8$) bila dibanding dengan kelompok mencit yang diinfeksi pada umur kebuntingan minggu kedua ($5,15 \times 10^8$) dan pertama ($3,55 \times 10^8$) (lihat Tabel 1). (Data tidak dibahas lebih jauh karena bukan merupakan tujuan utama dari penelitian ini dan hanya merupakan konfirmasi bahwa mencit eksperimental telah terinfeksi).

Peningkatan ekspresi IFN- γ pada limfosit desidua dan ekspresi Fas pada trofoblas dari hasil penelitian ini semakin memperjelas efek negatif infeksi *T. gondii* terhadap kebuntingan yaitu menyebabkan peningkatan apoptosis trofoblas. Roberts *et al.* (2001) menyatakan bahwa kualitas pengaruh negatif respons imun seahler terhadap *T. gondii* terhadap kebuntingan masih merupakan kontroversial.

Uraian di atas dapat diartikan bahwa komplikasi kebuntingan yang diakibatkan oleh *T. gondii* merupakan reaksi dari induk (maternal), yaitu terjadi aktivasi limfosit di desidua yang mengakibatkan peningkatan indeks apoptosis trofoblas. Desidua merupakan bagian dari maternal. Hal ini sedikit berbeda

dengan kesimpulan Sardjono (2005) yang mengatakan bahwa berhentinya proses kehamilan pada toxoplasmosis lebih diprakarsai oleh pihak fetal dibanding pihak maternal. Pada penelitian ini justru peningkatan aktivitas desidua (dari maternal) menyebabkan apoptosis trofoblas. Perbedaan ini kemungkinan karena terletak pada perbedaan pengamatan. Kesimpulan Sardjono (2005) didasarkan pada penemuan indeks apoptosis pada desidua lebih rendah dibanding dengan indeks apoptosis trofoblas dan apoptosis trofoblas berpengaruh terhadap penurunan jumlah janin, sedangkan apoptosis desidua tidak berpengaruh terhadap penurunan jumlah janin. Sardjono (2005) juga mengamati peningkatan kadar IFN- γ serum darah perifer (sirkulasi) dan disimpulkan bahwa kadar IFN- γ serum darah perifer tidak berhubungan langsung dengan peningkatan apoptosis trofoblas tetapi melalui peningkatan peningkatan caspase-3 di trofoblas. Sedangkan pada penelitian ini unit pengamatan dilakukan di plasenta yaitu desidua dan trofoblas. Mekanisme peningkatan apoptosis trofoblas melalui peningkatan ekspresi IFN- γ di limfosit desidua.

Pada penelitian ini peningkatan apoptosis trofoblas akibat infeksi *T. gondii* dipengaruhi oleh peningkatan ekspresi IFN- γ lokal, di lingkungan mikro plasenta, yaitu di desidua, bukan peningkatan IFN- γ dalam serum (sirkulasi). Hasil ini mendukung pendapat Mordue *et al* (2001) yang mengatakan bahwa peningkatan IFN- γ dalam serum pada infeksi akut *T. gondii* tidak berhubungan langsung dengan apoptosis beberapa organ seperti hati dan limpa. Pendapat tersebut dibuktikan dengan pemberian antibodi anti IFN- γ pada kasus infeksi akut *T. gondii* hanya menurunkan kadar IFN- γ dalam serum tetapi tidak mengurangi kerusakan hati.

IFN- γ sirkulasi tidak menjadi salah satu pengamatan dalam penelitian ini karena dari hasil penelitian pendahuluan yang kami lakukan menunjukkan bahwa peningkatan ekspresi IFN- γ sirkulasi sangat tergantung pada galur *T.gondii* dan umur kebuntingan mencit saat mendapatkan infeksi. Pada penelitian pendahuluan kami yang menggunakan galur lokal (Surabaya), menunjukkan bahwa infeksi pada pada umur kebuntingan minggu pertama tidak terjadi peningkatan ekspresi IFN- γ sirkulasi dan peningkatan baru terjadi pada kelompok mencit yang diinfeksi pada umur kebuntingan minggu ketiga (Suwanti dan Mufasirin, 2004; Sasmita dkk., 2004). Sedangkan peningkatan ekspresi IFN- γ di desidua terjadi pada mencit bunting yang diinfeksi galur lokal (Surabaya) baik pada umur kebuntingan minggu pertama maupun minggu ketiga (Suwanti dan Mufasirin, 2004; Sasmita dkk., 2004). Di samping itu, pengamatan respons lokal diharapkan lebih menggambarkan respons yang sesungguhnya yang terjadi di lokasi pengamatan, yaitu plasenta. Respons imun lokal lebih mencerminkan perubahan biologis yang terjadi pada daerah yang mengalami jejas (Putra, 1997), dalam hal ini plasenta. Plasenta merupakan tempat yang secara imunologis istimewa karena plasenta termasuk sebagai *immunologically privileged site*. Menurut Abbas *et al.* (2000) respons imun di tempat *immune privilege* terjadi tidak seperti repons imun secara umum. Banyak faktor yang terlibat pada *immune privilege*. Pada jaringan tersebut, tingkat inflamasi sering tidak sebanding dengan keberadaan parasit dan perubahan patologis lebih diakibatkan oleh reaksi imun seluler untuk mengontrol infeksi (rev Mordue *et al.*, 2001)

Hasil ini mempertegas uraian di atas bahwa infeksi *T. gondii* mengaktivasi limfosit desidua untuk menghasilkan IFN- γ , keberadaan IFN- γ di lingkungan

mikro plasenta memicu peningkatan ekspresi Fas di trofoblas. Peningkatan ekspresi Fas oleh trofoblas mengakibatkan kepekaan trofoblas terhadap apoptosis melalui Fas meningkat. Fas apabila berikatan dengan Fas ligan dari sel NK dan CTL seperti sudah dijelaskan di atas akan mengakibatkan *caspase cascade*. Pada proses ini caspase-3 sebagai caspase efektor diaktifkan. Jadi, hasil penelitian ini melengkapi hasil penemuan Sardjono (2005) yang mengatakan bahwa infeksi *T.gondii* menyebabkan peningkatan kadar IFN- γ dalam serum dan peningkatan kadar IFN- γ berpengaruh terhadap peningkatan Caspase-3 pada trofoblas.

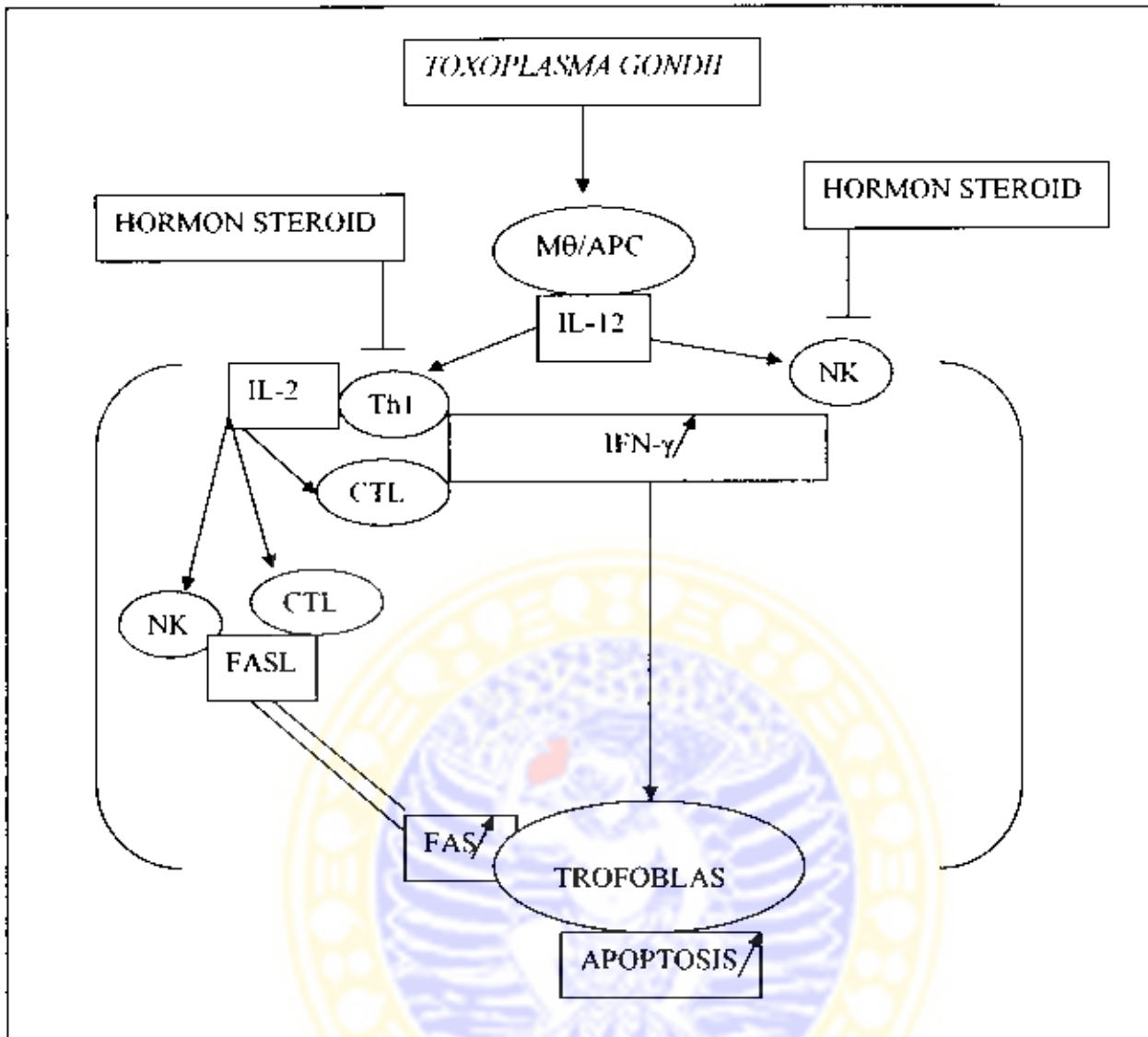
6.5 Temuan Baru

Berdasarkan hasil penelitian dan pembahasan, peneliti menemukan bahwa:

Infeksi *T. gondii* mampu memicu respons imun seluler di lokal plasenta, sehingga mempengaruhi perubahan lingkungan mikro plasenta dan peningkatan apoptosis trofoblas. Infeksi *T. gondii* meningkatkan aktivitas limfosit T dan sel NK di desidua yang ditandai dengan peningkatan jumlah limfosit desidua penghasil IFN- γ . Peningkatan ekspresi IFN- γ di plasenta memicu peningkatan ekspresi Fas di trofoblas dan meningkatkan kepekaan trofoblas terhadap apoptosis melalui Fas sehingga memicu peningkatan apoptosis trofoblas. Jadi, mekanisme peningkatan apoptosis trofoblas karena infeksi *T. gondii* melalui peningkatan aktivitas limfosit desidua penghasil IFN- γ dan peningkatan ekspresi Fas di trofoblas.

Berdasarkan hasil temuan ini maka kerangka konseptual mengalami perubahan menjadi seperti berikut:

Makrofag yang terinfeksi *T. gondii* memproduksi IL-12. Interleukin-12 merangsang sel NK untuk memproduksi IFN- γ . Makrofag juga berperan sebagai APC. Interleukin-12 yang dihasilkan oleh makrofag atau APC karena sensitisasi *T. gondii*, mendorong diferensiasi sel Th0 menjadi Th1 dan Th1 memproduksi IL-2 dan IFN- γ . *T. gondii* merupakan parasit intraseluler, sehingga makrofag atau APC yang terinfeksi mampu mengekspresikan MHC I sehingga dapat dikenali oleh sel T CTL. CTL yang tersensitisasi antigen memproduksi IFN- γ . Jadi, pada infeksi *T. gondii* terjadi aktivasi sel NK dan sel T yang dicirikan dengan peningkatan produksi IFN- γ . Peningkatan produksi IFN- γ di lingkungan mikro plasenta memicu peningkatan ekspresi Fas di sel trofoblas dan peningkatan kepekaan terhadap apoptosis melalui Fas. Interleukin-2 yang dihasilkan oleh sel Th1 karena rangsangan infeksi *T. gondii* mengaktifkan sel T CTL dan sel NK residua mengekspresikan Fas Ligan. Ikatan antara Fas dan Fas Ligan mengaktifkan Fas. Fas menarik adaptor protein FADD di sitoplasma trofoblas. FADD yang terikat Fas, menarik dan berinteraksi dengan procaspase-8. Procaspase-8 yang terikat oleh FADD, teraktivasi menjadi caspase-8 yang aktif. Caspase-8 memecah procaspase-3 menjadi caspase-3 yang aktif sehingga mampu memecah dan mengaktivasi sejumlah substrat seperti PARP dan DFF. PARP dan DFF yang teraktivasi menyebabkan fragmentasi DNA inti trofoblas sehingga terjadi apoptosis trofoblas.



Gambar 18. Kerangka Konseptual Hasil Penelitian

Keterangan: F1 : Infeksi *Toxoplasma gondii* pada mencit bunting

F2 : Apoptosis Trofoblas

() : daerah pengamatan, *maternal-fetal interface*

→ : menginduksi

|| : terjadi ikatan

—| : menghambat

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

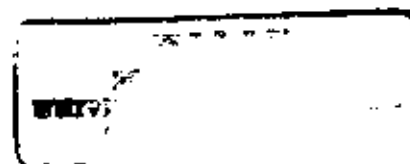
1. Respons inflamasi plasenta mencit yang diinfeksi *T. gondii* berbeda dengan mencit yang tidak diinfeksi. Pada plasenta mencit terinfeksi *T. gondii*, terjadi respons inflamasi plasenta yang ditandai dengan peningkatan persentase jumlah limfosit desidua yang menghasilkan IFN- γ , persentase jumlah makrofag desidua yang menghasilkan TNF- α , persentase jumlah sel trofoblas yang mengekspresikan Fas, persentase jumlah sel trofoblas yang mengekspresikan TNFR-1 dan indeks apoptosis trofoblas baik pada mencit bunting minggu pertama, kedua dan ketiga. Jadi, infeksi *T. gondii* berpengaruh terhadap perubahan lingkungan mikro plasenta yang menyebabkan terjadinya peningkatan apoptosis trofoblas.
2. Pola respons inflamasi plasenta akibat infeksi *T. gondii* berbeda pada setiap umur kebuntingan saat mendapatkan infeksi
3. Pola respons inflamasi plasenta akibat infeksi *T. gondii* pada umur kebuntingan minggu pertama didominasi oleh peningkatan indeks apoptosis dan persentase jumlah limfosit desidua yang menghasilkan IFN- γ .
4. Pola respons inflamasi plasenta akibat infeksi *T. gondii* pada umur kebuntingan minggu kedua didominasi oleh peningkatan indeks apoptosis.
5. Pola respons inflamasi plasenta akibat infeksi *T. gondii* pada umur kebuntingan minggu ketiga didominasi oleh peningkatan persentase

jumlah limfosit desidua yang menghasilkan IFN- γ dan persentase jumlah sel trofoblas yang mengekspresikan Fas

Kesimpulan dari keseluruhan hasil penelitian ini menunjukkan bahwa infeksi *T. gondii* meningkatkan aktivitas limfosit T dan sel NK di desidua yang dicirikan dengan peningkatan jumlah limfosit penghasil IFN- γ sehingga mempengaruhi perubahan lingkungan mikro plasenta dan peningkatan apoptosis trofoblas. Mekanisme peningkatan apoptosis trofoblas karena infeksi *T. gondii* melalui peningkatan jumlah limfosit T dan sel NK penghasil IFN- γ di desidua dan peningkatan ekspresi Fas di trofoblas.

7.2 SARAN

1. Peningkatan apoptosis trofoblas merupakan keadaan patologis dan merupakan ciri dari penolakan trofoblas sehingga dapat menyebabkan komplikasi kebuntingan berupa abortus, lahir mati dan berat lahir ringan. Infeksi *T. gondii* menyebabkan peningkatan apoptosis trofoblas melalui perubahan lingkungan mikro plasenta berupa peningkatan persentase jumlah limfosit desidua yang menghasilkan IFN- γ dan peningkatan ekspresi Fas di trofoblas maka perlu dilakukan intervensi terhadap peningkatan apoptosis trofoblas dengan memberikan antagonis dari IFN- γ dan antagonis dari Fas secara langsung di plasenta.
2. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk menetapkan aplikasi dan dosis pemberian antagonis dari IFN- γ dan Fas.



3. Perlu dilakukan penelitian lanjutan mengenai pengaruh infeksi *T. gondii* terhadap kadar IFN- γ , TNF- α , Fas solubel dan TNFR-1 solubel di dalam cairan plasenta (cairan amnion dan atau cairan chorion) dihubungkan dengan peningkatan ekspresi pada sel plasenta serta indeks apoptosis trofoblas. Sehingga apabila terdapat hubungan anatar peningkatan kadar di cairan dan ekspresi pada sel plasenta, dapat dikembangkan menjadi perangkat diagnostik dan digunakan untuk memprediksi peningkatan apoptosis trofoblas.



DAFTAR PUSTAKA

- Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS, 2000. Cellular and molecular immunology 4th ed. Philadelphia: WB Saunders Co, 235-269
- Abholz HH, 1993. Screening for toxoplasmosis in pregnancy: more harm than good. *Gesundheitswesen*, 55:410-413.
- Alexander J, Scharton-Kersten TM, Yap G, Roberts CW, Liew FY, Sher A, 1997. Mechanisms of innate resistance to *Toxoplasma gondii* infection. *Philos. Trans. R. Soc. London Ser. B*, 352:1355-1359.
- Allaire AD, Ballenger KA, Wells SR, McMahon MJ, Lessey BA, 2000. Placental Apoptosis in Preeclampsia. *Obstet and Gynecol*, 96. 271-276.
- Amirudin, 1999. Deteksi Antigen *Toxoplasma gondii* Isolat Lokal Dengan Cara *ELISA Sandwich* Menggunakan Antibodi Monoklonal. Tesis. Universitas Gadjah Mada. Yogyakarta
- Aplin JD, Kimber SJ, 2004. Trophoblast-uterine interactions at implantation. *Reprod. Biol. and Endocrinol.* 2:1-48.
- Araujo, FG, Handman E, Remington JS, 1980. Use of monoclonal antibodies to detect antigens of *Toxoplasma gondii* in serum and other body fluids. *Infect. Immun*, 30: 12-16.
- Arvola M, 2001. Immunological Aspects of Maternal-Foetal Interaction in Mice. Dissertations, Faculty of Science and Technology, Acta Universitatis Upsaliensis, Uppsala.
- Aschkenazi S, Straszewski S, Verwer KMA, Foellmer H, Rutherford T, Mor G, 2002. Differential Regulation and Function of the Fas/Fas Ligand System in Human Trophoblast Cells. *Biol. Reprod*, 66, 1853-1861.
- Ashkar AA, Di Santo JP, Croy BA, 2000. Interferon- γ Contributes to Initiation of Uterine Vascular Modification, Decidual Integrity, and Uterine Natural Killer Cell Maturation during Normal Murine Pregnancy. *J. Exp. Med*, 192: 259-270.
- Ashkenazi A, Dixit VM, 1998. Death Receptors: Signaling and Modulation. *Science*, 281:1305-1308.
- Baines. MG, 2002. Immunology of Pregnancy. Document Online: <http://www.microimm.mcgill.ca/pdf>, diakses tanggal 14-09-2003 jam 23 10.

- Balkundi DR, Ziegler JA, Watchko JF, Craven C, Trucco M, 2003. Regulation of FasL/Fas in Human Trophoblasts: Possible Implications for Chorioamnioniti. *Biol. Reprod*, 69: 718–724.
- Beaman MH, Hunter CA, Remington JS, 1994. Enhancement of Intracellular Replication of *Toxoplasma gondii* by IL-6 Interactions with Interferon-gamma and TNF-alpha. *J. Immunol*, 153:4583-4587.
- Bellanti C, 1990. *Immunologi III*. Yogyakarta: Gadjah Mada Press.
- Berger A, 2000. Th1 and Th2 responses: what are they? *BMJ* 321: 424.
- Bohne W, Heesemann J, Gross U, 1994. Reduced replication of *Toxoplasma gondii* is necessary for induction of bradyzoite-specific antigens: a possible role for nitric oxide in triggering stage conversion. *Infect. Immun*, 62:1761-1767.
- Bohne W, Gross U, Ferguson DJ, Heesemann J, 1995. Cloning and Characterization of a bradyzoite-Specifically Expressed Gene (Hsp30/bag1) of *Toxoplasma gondii*, Related to Genes Encoding Small Heat-Shock Proteins of Plants, *Mol. Microbiol*, 16:1221-1230.
- Burnett TG, Hunt JS, 2000. Nitric Oxide Synthase-2 and Expression of Perforin in Uterine NK Cells. *J. Immunol*, 164: 5245-5250.
- Barrett KL, Willingham JM, Garvin AJ and Willingham MC. 2001. **Advances in Cytochemical Methods for Detection of Apoptosis**. *J Histochem Cytochem* 49:821–832
- Buxton D, 1998. Protozoan infections (*Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum* and *Sarcocystis* spp.) in sheep and goats: recent advances. *Vet Res*, 29:289–310. (Abstract).
- Buxton D, Finlayson J, 1986. Experimental infection of pregnant sheep with *Toxoplasma gondii*: pathological and immunological observations on the placenta and foetus. *J. Comp. Pathol*, 96:319-333.
- Caamaño, J, Tato C, Cai G, Villegas E, Speirs K, Craig L, Alexander J, Hunter CA, 2000. Identification of a role for NF- κ B₂ in the regulation of apoptosis and in maintenance of T cell-mediated immunity to *Toxoplasma gondii*. *J. Immunol*, 165:5720-5728.
- Chan G, Hemmings DG, Yurochko AD, Guilbert LJ, 2002. Human Cytomegalovirus-Caused Damage to Placental Trophoblasts Mediated by Immediate-Early Gene-Induced Tumor Necrosis Factor- α *Am J Pathol*, 161:1371-1381.

- Channon, JY, Miselis KA, Minns LA, Dutta C, Kasper LH, 2002. *Toxoplasma gondii* Induces Granulocyte Colony-Stimulating Factor and Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor Secretion by Human Fibroblasts: Implications for Neutrophil Apoptosis. *Infect. and Immun*, 70:6048-6057.
- Channon JY, Seguin RM, Kasper LH, 2000. Differential Infectivity and Division of *Toxoplasma gondii* in Human Peripheral Blood Leukocytes. *Infection and Immunity*, 68: 4822-4826.
- Chardes T, BuzoniGatel D, Lepage A, Bernard F, Bout D, 1994. *Toxoplasma gondii* oral infection induces specific cytotoxic CD8alpha/beta + Thy-1 + gut intraepithelial lymphocytes, lytic for parasite-infected enterocytes. *J. Immunol*, 153:4596-4603.
- Chardes T, VelgeRoussel F, Mevelec P, Mevelec MN, BuzoniGatel D, Bout D, 1993. Mucosal and systemic cellular immune responses induced by *Toxoplasma gondii* antigens in cyst orally infected mice. *Immunology*, 78:421-429.
- Clark DA, Coulam CB, Daya S, Chaouat G, 2001. Unexplained sporadic and recurrent miscarriage in the new millenium: a critical analysis of immune mechanisms and treatments. *Hum. Reprod*, 7: 501-511.
- Cook AJC, Gilbert RE, Buffolano W, Zufferey J, Petersen E, Jenum PA, 2000. Sources of *Toxoplasma* infection in pregnant women: European multicentre case-control study. *BMJ*, 321:142-147.
- Crocker IP, Cooper S, Ong SC, Baker PN, 2003. Differences in Apoptotic Susceptibility of Cytotrophoblasts and Syncytiotrophoblasts in Normal Pregnancy to Those Complicated with Preeclampsia and Intrauterine Growth Restriction.. *Am. J. Patho*, 162:637-643.
- Dachlan EG, 1999. IgM Anti Toksoplasma Janin dalam Cairan ketuban sebagai Indikator Toksoplasmosis Kongenital serta Korelasinya dengan IgM Anti Toksoplasma Seromaternal. Disertasi PPS Unair. Surabaya.
- Dardé M, Bouteille B, Pestre-Alexandre M, 1992. Isoenzyme analysis of 35 *Toxoplasma gondii* isolates and the biological and epidemiological implications. *J. Parasitol*, 78:786-794.
- Deckert-Schlüter M, Bluethmann H, Rang A, Hof H, Schlüter D, 1998. Crucial Role of TNF Receptor Type 1 (p55), But Not of TNF Receptor Type 2 (p75), in Murine Toxoplasmosis. *J. Immunol*, 160: 3427-3436.
- Denkers EY, 1999. T lymphocyte-dependent effector mechanisms of immunity to *Toxoplasma gondii*. *Microbes Infect*, 1:699-708.

- Denkers EY, Gazzinelli RT, 1998. Regulation and Function of T-Cell-Mediated Immunity during *Toxoplasma gondii* Infection. *Clin. Microbiol. Rev.*, 11:569-588.
- Derouich-Guergour D, Aldebert D, Vigan I, Jouvin-Marche E, Marche PN, Aubert D, Ambroise-Thomas P, Pelloux H, 2002. *Toxoplasma gondii* infection can regulate the expression of tumour necrosis factor- α receptors on human cells in vitro. *Parasite Immunol*, 24, 271-279.
- Desmonts G, Naot Y, Remington JS, 1981. Immunoglobulin M-immunosorbent agglutination assay for diagnosis of infectious diseases: diagnosis of acute congenital and acquired *Toxoplasma* infections. *J. Clin. Microbiol*, 14:486-491.
- DiFederico E, Genbacev O, Fisher SJ, 1999. Preeclampsia Is Associated with Widespread Apoptosis of Placental Cytotrophoblasts within the Uterine Wall. *Am. J. Pathol*, 155:293-301.
- Dobbin CA, Smith NC, Johnson AM, 2002. Heat Shock Protein 70 Is a Potential Virulence Factor in Murine *Toxoplasma* Infection Via Immunomodulation of Host NF- κ B and Nitric Oxide. *J. Immunol*, 169: 958-965.
- Dosiou C, Giudice LC, 2005. Natural Killer Cells in Pregnancy and Recurrent Pregnancy Loss: Endocrine and Immunologic Perspectives. *Endocrine Reviews*, 26 : 44-62.
- Dubey JP, 2000. Sources of *Toxoplasma gondii* infection in pregnancy. (Editorial) *BMJ*. Document online <http://www.findarticles.com/>. Diakses tanggal 12-2-2003 jam 22.45.
- Dubey JP, Kirkbirde CA, 1990. Toxoplasmosis and other causes of abortions in sheep from north central United State. *JAVMA*, 196: 287-290.
- Dubey JP, Schlafer DH, Urban JF, Lindsay DS, 1990. Lesions in fetal pigs with transplacentally-induced toxoplasmosis. *Vet. Pathol*, 27: 411-418.
- Dubey JP, Lindsay DS, Speer CA, 1998. Structures of *Toxoplasma gondii* Tachyzoites, Bradyzoites, and Sporozoites and Biology and Development of Tissue Cysts. *CMR*, 11 (2): 267-299.
- Dumur CI, Almenara JA, Durandi S, Flury A, Koritschoner NP, Patrito LC, 2001. A new death domain associated with gestational trophoblastic diseases induces apoptosis in distinct cell types. *Internation. J. Oncol*, 19: 1161-1167.
- Duncanson P, Terry RS, Smith JE, Hide G, 2001. High levels of congenital transmission of *Toxoplasma gondii* in a commercial sheep flock. *Int J Parasitol*, 31:1699-703.

- Dupouy-Camet J, 2002. Immunopathogenesis of Toxoplasmosis in Pregnancy Document online: <http://www.users.imagnet.fr/dupouyca/toxoplasmosis> diakses tanggal 5-4-2002 jam 07:00.
- Ehring GR, Kerschbaum HH, Eder C, Neben AL, Fanger CM, Khoury RM, Negulescu P, MD Cahalan, 1998. A nongenomic mechanism for progesterone-mediated immunosuppression: inhibition of K⁺ channels, Ca²⁺ signaling, and gene expression in T lymphocytes. *J. Exp. Med.*, 188:1593-1602.
- Ejima K, T Koji, Tsuruta D, Nanri H, Kashimura M, Ikeda M, 2000. Induction of Apoptosis in Placentas of Pregnant Mice Exposed to Lipopolysaccharides: Possible Involvement of Fas/Fas Ligand System. *Biol. of Reprod*, 62: 178-185.
- Ferro EAV, Silva DAO, Bevilacqua E, Mineo JR, 2002. Effect of *Toxoplasma gondii* Infection Kinetics on Trophoblast Cell Population in *Calomys callosus*, a Model of Congenital Toxoplasmosis. *IAI*, 70: 7089-7094.
- Fesik SW, Shi V, 2001. Controlling the Caspases. *Science*, 294 : 1477 -1478.
- Flori P, Hafid J, Bourlet T, Raberin H, Genin C, Sung RTM, 2002. Experimental model of congenital toxoplasmosis in guinea-pigs: use of quantitative and qualitative PCR for the study of maternofetal transmission. *J. Med. Microbiol.*, 51: 871-878.
- Fortier B, Rolland D, Ajna F, Dubremetz JF, Vernes A, 1991. Detection of specific antibodies to *Toxoplasma gondii* by competitive enzyme immunoassay using a monoclonal antibody against the P30 antigen. *Eur.J.Clin.Microbiol.Infect*, 10:38-40.
- Frenkel JK, 1990. Transmission of toxoplasmosis and role of immunity in limiting transmission and illness. *JAVM*, 196: 233-240.
- Fried M, Muga RO, Misore AO, Duffy PE, 1998. Malaria Elicits Type 1 Cytokines in the Human Placenta: IFN- γ and TNF- α Associated with Pregnancy Outcomes. *J. Immunol*, 160: 2523-2530.
- Gavrilescu LC, Denkers EY, 2001. IFN- γ overproduction and high level apoptosis are associated with high but not low virulence *Toxoplasma gondii* infection. *J. Immunol*, 167: 902-909.
- Gazzinelli RT, Hakim FT, Hieny S, Shearer GM, Sher A, 1991. Synergistic role of CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes in IFN-gamma production and protective immunity induced by an attenuated *Toxoplasma gondii* vaccine. *J. Immunol*, 146:286-292.

- Gazzinelli RT, Oswald IP, James SL, Sher A, 1992. IL-10 inhibits parasite killing and nitrogen oxide production by IFN-gamma-activated macrophages. *J. Immunol*, 148:1792-1796.
- Gazzinelli RT, Wysocka M, Hieny S, ScharonKersten T, Cheever A, Kuhn R, Muller W, Trinchieri G, Sher A, 1996. In the absence of endogenous IL-10, mice acutely infected with *Toxoplasma gondii* succumb to a lethal immune response dependent on CD4⁺ T cells and accompanied by overproduction of IL-12, IFN-gamma, and TNF-alpha. *J. Immunol*, 157:798-805.
- Ghaffar A, 2001. Blood and Tissue Protozoa, MBIM 650/750 Medical Microbiology. Document online URL: <http://www.med.sc.edu/85/parasitology/blood-proto.htm> diakses tanggal 1-2-2005 jam 07:00.
- Goebel S, Luder CGK, Gross U, 1999. Invasion by *Toxoplasma gondii* protects human-derived HL-60 cells from actinomycin D-induced apoptosis. *Med Microbiol. Immunol*, 187: 221-226
- Goebel S, Gross U, Luder CGK, 2001. Inhibition of host cell apoptosis by *Toxoplasma gondii* is accompanied by reduced activation of the caspase cascade and alterations of poly(ADP-ribose) polymerase expression. *J Cell Sci*, 114: 3495-3505.
- Goldsby RA, Kind TJ, Osborne BA, 2000. Kuby: Immunology. 4th ed. New York: WH. Freeman and Co, 31-33, 260-263,351-369.
- Gorivodsky M, Zemlyak I, Orenstein H, Savion S, Fein A, Torchinsky A, Toder V, 1998. TNF- α Messenger RNA and Protein Expression in the Uteroplacental Unit of Mice with Pregnancy Loss. *J. Immunol*, 160: 4280-4288.
- Grimwood J, Smith JE, 1992. *Toxoplasma gondii* : the role of a 30-kDa surface proteins in host cell invasion. *Exp. Parasitol*, 74: 106-111.
- Grimwood J, Smith JE, 1996. *Toxoplasma gondii* : the role of parasite surface and secreted proteins in host cell invasion. *Int J Parasitol*, 26:169-173.
- Guifang C, Kastelein R, Hunter CA, 2000. Interleukin-18 (IL-18) enhances innate IL-12-mediated resistance to *Toxoplasma gondii*. *Infect. Immun*, 68:6932-6938.
- Gupta S, 2003. Molecular signaling in death receptor and mitochondrial pathways of apoptosis (Review). *Intern. J. Oncol*, 22: 15-20.
- Hanna N, Hanna I, Hleb M, Wagner E, Dougherty J, Balkundi D, Padbury J, Sharma S, 2000. Gestational Age-Dependent Expression of IL-10 and Its

- Receptor in Human Placental Tissues and Isolated Cytotrophoblasts. *J. Immunol*, 164: 5721-5728.
- Harber M, Sundstedt A, Wraith D, 2000. The Role of Cytokines in Immunological Tolerance: Potential for Therapy. *Expert Review in Molecular Medicine*: <http://www.ermm.cbcu.cam.ac.uk/0000214-3h.htm> diakses tanggal 08-06-2002 jam 07:19.
- Haskell, 2001. Small Ruminant Clinical Diagnosis and Therapy. Document online http://www.rmnsba.org/SMALL_RUMINAT.pdf diakses 31-01-2005 jam 23:53.
- Hermawan, 1988. Survei Serologis terhadap Toxoplasmosis pada Ayam Buras di Kabupaten Lamongan dengan Uji Hemaglutinasi Tak Langsung. Skripsi. Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga Surabaya.
- Hisaeda H, Sakai T, Ishikawa H, Maekawa Y, Yasutomo K, Good RA, Himeno K, 1997. Heat shock protein 65 induced by $\gamma\delta$ T cells prevents apoptosis of macrophages and contributes to host defense in mice infected with *Toxoplasma gondii*. *J. Immunol*, 159: 2375-2381.
- Hohlfeld P, Daffos F, Costa JM, Thulliez P, Forestier F, Vidaud M, 1994. Prenatal diagnosis of congenital toxoplasmosis with a polymerase-chain-reaction test on amniotic fluid. *N Engl J Med*, 331:695-699.
- Holliman RE, 1995. Congenital toxoplasmosis: prevention, screening and treatment. *J Hosp Infect*, 30:179-90.
- Howe DK, Summers BC, Sibley LD, 1996 :Acute virulence in mice is associated with markers on chromosome VIII in *Toxoplasma gondii*. *Infect Immun*, 64: 5193-5198.
- Howe DK, Honore S, Derouin F, Sibley LD, 1997. Determination of genotypes of *Toxoplasma gondii* strains isolated from patients with toxoplasmosis. *J Clin Microbiol*, 35:1411-1414.
- Hu MS, Schwartzman JD, Yeaman GR, Collins J, Seguin R, Khan IA, Kasper LH, 1999. Fas-FasL Interaction Involved in Pathogenesis of Ocular Toxoplasmosis in Mice. *Infect. Immun*, 67: 928-935.
- Hughes JM, 2000. Preventing Congenital Toxoplasmosis. *Recommendation and Reprots*, 49:57-75.
- Hunter CA, Ellis-Neyer L, Gabriel KE, Kennedy MK, Grabstein KH, Linsley PS, Remington JS, 1997. The Role of The CD28/B7 Interaction in The Regulation of NK Cell Responses During Infection with *Toxoplasma gondii*. *J. Immunol*, 58: 2285-2293.

- Jenum PA, Stray-Pedersen B, Melby KK, Kapperud G, Whitelaw A, Eskild A, Eng J, 1998. Incidence of *Toxoplasma gondii* Infection in 35,940 Pregnant Women in Norway and Pregnancy Outcome for Infected Women. *J. Clin Microbiol*, 36: 2900-2906.
- Johnson AM, 1990. *Toxoplasma: Biology, Pathology, Immunology, and Treatment*. In Long, PL. *Coccidiosis of Man and Domestic Animals*. United States: CRC Press, Inc. 122-144.
- Jones J. 2003. Congenital toxoplasmosis. *American Family Physician*. Document online <http://www.findarticles.com/> diakses tanggal 12-2-2003 jam 22.45.
- Jordan JA, Huff D, DeLoia JA, 2001. Placental Cellular Immune Response in Women Infected with Human Parvovirus B19 during Pregnancy. *Clin. and Diag. Lab. Immunol*, 8:288-292.
- Kanellopoulos-Lengevin C, Caucheteux SM, Verbeke P, Ojcius DM, 2003. Tolerance of the fetus by the maternal immune system: role of inflammatory mediators at the feto-maternal interface. *Reprod. Biol. Endocrinol*, 1: 121.
- Kawana K, Kawana Y, Schust DJ, 2005. Female Steroid Hormones Use Signal Transducers and Activators of Transcription Protein-Mediated Pathways to Modulate the Expression of T-bet in Epithelial Cells: A Mechanism for Local Immune Regulation in the Human Reproductive Tract. *Mol. Endocrinol*, 19:2047-2059.
- Kauma SW, Huff TF, Hayes N, Nilkaeo A, 1999. Placental Fas Ligand Expression Is a Mechanism for Maternal Immune Tolerance to the Fetus. *J. Clin. Endocrinol. & Metabol*, 84:2188-2194.
- Khan IA, Matsuura T, Kasper LH, 1996. Activation-mediated CD4⁺ T cell unresponsiveness during acute *Toxoplasma gondii* infection in mice. *Int. Immun*, 8:887.
- Kliman HJ, 2005. Trophoblast Infiltration. <http://info.med.yale.edu/obgyn/kliman/placenta/articles/Troph.html>. diakses 1-2-2005 jam 07.01.
- Langermans JAM, Vander Hulst MEB, Nibbering PH, Hiemstra PS, Fransen L, Van FR, 1992. IFN-gamma-induced L-arginine-dependent toxoplasmatatic activity in murine peritoneal macrophages is mediated by endogenous tumor necrosis factor-alpha. *J. Immunol*, 148:568-574.
- Levine ND, 1985. *Veterinary Protozoology*. 1st ed. Ames: Iowa State University Press.
- Liesenfeld O, Kang H, Park D, Nguyen TA, Parkhe CV, Watanabe H, Abo T, Sher A, Remington JS, Suzuki Y, 1999. TNF-alpha, nitric oxide and IFN-

gamma are all critical for development of necrosis in the small intestine and early mortality in genetically susceptible mice infected perorally with *Toxoplasma gondii*. *Parasite Immunol*, 21:365-376.

- Liesenfeld O, Kosek J, Remington JS, Suzuki Y, 1996. Association of CD4+ T cell-dependent, interferon-gamma-mediated necrosis of the small intestine with genetic susceptibility of mice to peroral infection with *Toxoplasma gondii*. *J. Exp. Med*, 184:597-607.
- Lin H, Mosmann TR, Guilbert L, Tuntipopipat S, Wegmann TG, 1993. Synthesis of T helper 2-type cytokines at the maternal fetal interface. *J. Immunol*, 151:4562-4573.
- Lyons RE, Johnson AM, 1995. Heat Shock Protein of *Toxoplasma gondii*, *Parasite Immunol*, 17:353-359.
- Lyons RE, Johnson AM, 1998. Gen Sequence and Transcription Differences in 70 kDa Heat Shock Protein Correlate with Murine Virulence of *Toxoplasma gondii*, *Int. J. Parasitol*, 28:1041-1051.
- Mack DG, Jaffe HA, 2001. Effect of administration of a recombinant adenovirus expressing the genes for IFN-gamma and interleukin -12 on acute murine toxoplasmosis. *J Interferon Cytokine Res*, 21:777-783.
- Mack DG, McLeod R, 1992. Human *Toxoplasma gondii*-specific secretory immunoglobulin A reduces *T. gondii* infection of enterocytes in vitro. *J. Clin. Investig*, 90:2585-2592.
- Maslachah L, 1996. Pemeriksaan Toxoplasmosis Secara Serologik pada Kambing di RPH Dati II Tuban. *Media Ked. Hewan*, 12: 247-252.
- Medicine.ucsd.edu, 2002. House (Domestic, Laboratory) Mouse *Mus musculus* <http://medicine.ucsd.edu/cpa/mous.html>. diakses. Tanggal 9-2-2005. jam 22.20.
- Mjihdi A, Lambot MA, Stewart IJ, Detournay O, Noël JC, Carlier Y, Truysens C, 2002. Acute *Trypanosoma cruzi* Infection in Mouse Induces Infertility or Placental Parasite Invasion and Ischemic Necrosis Associated with Massive Fetal Loss. *Am. J. Pathol*, 161:673-680.
- Miyaura H, Iwata M, 2002 Direct and indirect inhibition of Th1 development by progesterone and glucocorticoids. *J Immunol*, 168:1087-1094.
- Molestina RE, Payne TM, Coppens I, Sinai AP, 2003. Activation of NF- κ B by *Toxoplasma gondii* correlates with increased expression of antiapoptotic genes and localization of phosphorylated I κ B to the parasitophorous vacuole membrane *J Cell Science*, 116:4359-4371.

- Monk M, 1987. *Mamalian Development: a practical approach*. Washington DC: IRL Press.
- Mor G, Abrahams VM, 2003. Potential role of macrophages as immunoregulators of pregnancy *Reprod. Biol. and Endocrinol*, 1:119
- Mor G, Gutierrez LS, Eliza M, Kahyaoglu F, Arici A 1998. Fas-Fas ligand system-induced apoptosis in human placenta and gestational trophoblastic disease *Am J Reprod Immunol*, 40 89-94.
- Mordue DG, Monroy F, Regina ML, Dinarello CA, Sibley LD, 2001 Acute Toxoplasmosis Leads to Lethal Overproduction of Th1 Cytokines. *The J. of Immunol*, 167:4574-4584
- Mufasirin, Suwanti LT, 2001. *Studi Prevalensi Toxoplasmosis pada Daging Kambing yang Dijual di Pasar Tradisional dan Pasar Swalayan di Kotamadya Surabaya*, Surabaya: Lemlit Unair.
- Mun, HS, Aosai F, Yano A, 1999. Role of *Toxoplasma gondii* HSP70 and *Toxoplasma gondii* HSP30/bagl1 in Antibody Formation and Prophylactic Immunity in Mice Experimentally Infected with *Toxoplasma gondii*, *Microbiol. Immunol*, 43:471-479.
- Munday BL, Dubey JP, 1986. Serology of experimental toxoplasmosis in pregnant ewes and their foetuses. *Aust Vet J* 63:353-354. (Abstract).
- Nagata S, 1997. Apoptosis by death factor. *Cell*, 88:355-365
- Nagineeni CN, Detrick B, Hooks JJ, 2002. Transforming Growth Factor-Beta in Human Retinal Pigment Epithelial Cell is Enhanced by *Toxoplasma gondii*: A Possible Role in The Immunopathogenesis of retinochoroiditis, *Clin. Exp. Immunol*, 128:372-378.
- Nash PB, Purner MB, Leon RP, Clarke P, Duke RC, Curiel TJ, 1998. *Toxoplasma gondii*-infected cells are resistant to multiple inducers of apoptosis. *J. Immunol*, 160:1824-1830.
- Nickdel MB, Robert F, Brombacher F, Alexander J and Robert CW, 2001. Counter-Protective Role for Interleukin-5 during Acute *Toxoplasma gondii* Infection, *Inf. Immun*, 69:1044-1052.
- Nigro G, Piazza J, Paesano R, Mango T, Provvedi S, Capuano O, Pollastrini L, 1999. Low levels of natural killer cells in pregnant women transmitting *Toxoplasma gondii*. *Prenat. Diagn*, 19:401-404
- Olivares EG, Muñoz R, Tejerizo G, Montes MJ, Gómez-Molina F, Abadía-Molina AC, 2002. Decidual Lymphocytes of Human Spontaneous

Abortions Induce Apoptosis but Not Necrosis in JEG-3 Extravillous Trophoblast Cells. Biol. Reprod, 67:1211-1217.

Osawa Y, Nagaki M, Banno Y, Brenner DA, Asano T, Nozawa Y, Moriwaki H, Nakashima S, 2002. Tumor Necrosis Factor Alpha-Induced Interleukin-8 Production via NF- κ B and Phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt Pathways Inhibits Cell Apoptosis in Human Hepatocytes. Infect. and Immun, 70: 6294-6301.

Payne SG, Smith SC, Davidge ST, Baker PN, Guilbert LJ, 1999. Death Receptor Fas/Apo-1/CD95 Expressed by Human Placental Cytotrophoblasts Does Not Mediate Apoptosis. Biol. Reprod, 60:1144-1150.

Pediatric Database, 1994. Congenital Toxoplasmosis. Document online <http://www.icondata.com/health/pedbase/files/CONGEN14.HTM> diakses 12-2-2003 jam 22.50.

Peltier MR, 2003. Review Immunology of term and preterm labor. Repro. Biol. and Endocrino, 1:122.

Phillips TA, Ni J, Hunt JS, 2001. Death-Inducing Tumour Necrosis Factor (TNF) Superfamily Ligands and Receptors are Transcribed in Human Placentae, Cytotrophoblasts, Placental Macrophages and Placental Cell Lines. Placenta, 22: 663-672.

Piccinni MP, Scaletti C, Vultaggio A, Maggi E, Romagnani S, 2001. Defective production of LIF, M-CSF and Th2-type cytokines by T cells at fetomaternal interface is associated with pregnancy loss. J. Reprod. Immunol, 52 (1-2):35-43.

Piccinni MP, Maggi E, Romagnani S, 2000. Role of hormone controlled T-cell cytokines in the maintenance of pregnancy. Biochem. Soc. Trans, 28:212-215.

Prigione I, Facchetti P, Lecordier L, Deslee D, Chiesa S, Cesbron-Delouw MF, Pistoia V, 2000. T Cell Clones Raised from Chronically Infected Healthy Humans by Stimulation with *Toxoplasma gondii* Excretory-Secretory Antigens Cross-React with Live Tachyzoites: Characterisation of the Fine Antigenic Specificity of the Clones and Implications for vaccine Development. J. Immunol, 164: 3741-3748.

Putra ST, 1997. Konsep Patobiologi dan Imunomukosal dalam Immunologi Mukosal. Ed.1. Surabaya:Gramik FK Unair.

Raghupathy R, 1997a. Maternal anti-placental cell-mediated reactivity and spontaneous abortions. Am. J. Reprod. Immunol, 37:478-484.

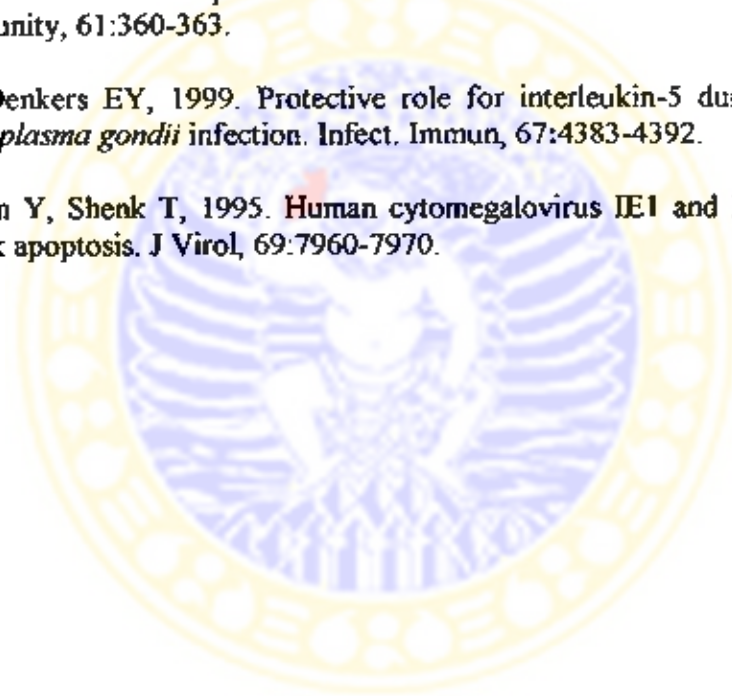
- Raghupathy R, 1997b. Th1-type immunity is incompatible with successful pregnancy. *Immunol. Today*, 18:478-482.
- Raghupathy R, 2001. Pregnancy: success and failure within the Th1/Th2/Th3 paradigm. *Semin. Immunol*, 13:219-227.
- Raghupathy R, Makhseed M, Azizieh F, Ornu A, Gupta M, Farhat R, 2000. Cytokine production by maternal lymphocytes during normal human pregnancy and in unexplained recurrent spontaneous abortion. *Human Reprod*, 15:713-718.
- Raghupathy R, Makhseed M, Azizieh F, Hassan N, Al-Azemi M, Al-Shamali E, 1999. Maternal Th1- and Th2-type reactivity to placental antigens in normal human pregnancy and unexplained recurrent spontaneous abortions. *Cell Immunol*, 196:122-130.
- Rayet B, Lopez-Guerrero JA, Rommelaere J, Dinsart C, 1998. Induction of Programmed Cell Death by Parvovirus H-1 in U937 Cells: Connection with the Tumor Necrosis Factor Alpha Signalling Pathway. *J. Virol*, 72: 8893-8903.
- Reed JC, 2000. Mechanisms of Apoptosis. *Am. J. Pathol*, 157: 1415-1430.
- Roberts CW, 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. *Parasitol*, 104:19-23.
- Roberts T, Frenkel JK, 1990. Estimating income losses and other preventable costs caused by congenital toxoplasmosis in people in the United States. *JAVMA*, 196: 249-256.
- Roberts CW, Ferguson DJP, Jebbari H, Satoskar A, Bluethmann H, Alexander J, 1996. Different roles for interleukin-4 during the course of *Toxoplasma gondii* infection. *Infect. Immun*, 64:897-904.
- Roberts CW, Walker W, Alexander J, 2001. Sex-Associated Hormones and Immunity to Protozoan Parasites. *Clin. Micro. Rev*, 14:476-488.
- Roby KF, Hunt JS, 1994. Mouse endometrial tumor necrosis factor- α mRNA and protein localization and regulation by estradiol and progesterone. *Endocrinol*, 135:2780.
- Rossant J, Cross JC, 2001. Placental Development: Lessons from Mouse Mutan. *Reviews*, 2:538- 548.
- Runić R, Lockwood CJ, LaChapelle L, Dipasquale B, Demopoulos RI, Kumar A, Guller S, 1998. Apoptosis and Fas Expression in Human Fetal Membrans. *J. Clin. Endocrin. & Metabol*, 83:660-666.

- Sardjono TW, 2005. Pengaruh Infeksi *Toxoplasma* Pada Hasil Kehamilan Melalui Interferon Gama (IFN- γ), *Caspase-3* dan Apoptosis Sel-sel Plasenta. Disertasi. Program Pasca Sarjana Universitas Airlangga Surabaya.
- Sasmita R, 1991. Kucing dan Ternak sebagai Sumber Penularan Toxoplasmosis. Kumpulan Makalah Seminar "Dampak Toxoplasmosis pada Ibu Hamil", Universitas Airlangga.
- Sasmita R, Suprihati E, Hastutiek P, Suwanti LT, 2004. Peningkatan Ekspresi Interferon-gamma (IFN- γ) terhadap Angka Penularan Kongenital pada mencit bunting yang diinfeksi dengan *T. gondii*. Seminar Biologi molekuler Nasional II. Unair Surabaya.
- SchartonKersten TM, Yap G, Magram J, Sher A, 1997. Inducible nitric oxide is essential for host control of persistent but not acute infection with the intracellular pathogen *Toxoplasma gondii*. *J. Exp. Med.*, 185:1261-1273.
- Schlüter D, Meyer T, Kwok LY, Montesinos-Rongen M, Lütjen S, Strack A, Schmitz ML, Deckert M, 2002. Phenotype and Regulation of Persistent Intracerebral T Cells in Murine *Toxoplasma* Encephalitis. *The J. Immunol.*, 169: 315-322.
- Sciammarella J, 2001. Toxoplasmosis. *eMed. J.*, 2(9). Document online <http://www.emedicine.com/emerg/topic601.html> diakses 12-2-2003 jam 22.50
- Sharif-Askari K, Alam A, Rhéaume E, Beresford PJ, Scotto C, Sharma K, Lee D, DeWolf WE, Nuttall ME, Lieberman J and Sékaly R-P. 2001 Direct cleavage of the human DNA fragmentation factor-45 by granzyme B induces caspase-activated DNase release and DNA fragmentation. *The EMBO Journal*, 20:3101-3113
- Shen DF, Matteson DM, Tuailton N, Suedekum BK, Buggage RR, Chan C, 2001. Involvement of Apoptosis and Interferon- γ in Murine Toxoplasmosis. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 42:2031-2036.
- Sher A, Denkers EY, Gazzinelli RT, 1995. Induction and regulation of host cell-mediated immunity by *Toxoplasma gondii*. *Ciba Found. Symp.*, 195:95-109
- Shirahata T, Muroya N, Ohta C, Goto H, Nakane A, 1992. Correlation between increased susceptibility to primary *Toxoplasma gondii* infection and depressed production of gamma interferon in pregnant mice. *Microbiol. Immunol.*, 36:81-91.
- Shirahata T, Muroya N, Ohta C, Goto H, Nakane A, 1993. Enhancement by recombinant human interleukin 2 of host resistance to *Toxoplasma gondii* infection in pregnant mice. *Microbiol. Immunol.*, 37:583-590.

- Shiraishi H, Hayakawa S, Satoh K, 1996. Murine experimental abortion by IL-2 administration is caused by activation of cytotoxic T lymphocytes and placental apoptosis. *J. Clin. Lab. Immunol*, 48:93-108.
- Sibley LD, Adams LB, Fukutomi Y, Krahenbuhl JL. 1991. Tumor necrosis factor-alpha triggers antitoxoplasmal activity of IFN-gamma primed macrophages. *J. Immunol*, 147:2340-2345.
- Shimaoka Y, Hidaka Y, Tada H, Nakamura T, Mitsuda N, Morimoto Y, Murata Y, Amino N, 2000. Changes in cytokine production during and after normal pregnancy. *Am. J. Reprod. Immunol*, 44:143-147.
- Smith AN, Carter QI, Kniss DA, Brown TL, 2001. Characterization of A TGF-Beta-Responsive Human Trophoblast-Derived Cell Line, *Placenta*, 22:425-431.
- Smith JE, Boothroyd JC, Hunter C, Petersen E. 1997a.: Progress in toxoplasmosis research. *Parasitol Today*, 13:245-247.
- Smith SC, Baker PN, Symonds EM, 1977b. Placental apoptosis in normal human pregnancy. *Am J Obstet Gynecol*, 177:57-65.
- Smith SC, Symonds EM, Baker PN, 1997c. Increased placental apoptosis in intrauterine growth restriction. *Am J Obstet Gynecol*, 177:1395-1401.
- Soares MJ, 2005. The Placenta and The Biology of Pregnancy. <http://www2.kumc.edu/soalab/placenta-and-the-biology-of-preg.htm> diakses tanggal 9-2-2005 jam 06.31.
- Spencer E, Johnson GA, Burghardt RC, Bazer FW, 2004. Progesterone and Placental Hormone Actions on the Uterus: Insights from Domestic Animals. *Biol. Reproduct*, 71:2-10.
- Spronk, 2000. Practitioner's Approach to Ovine Abortion. Document on line <http://www.pipevet.com/articles/Practitioner's-Approach-to-Ovine-Abortion.htm> diakses tanggal 13/06/2004 jam 21:00.
- Steel RGD, Torrie JH, 1991. Prinsip dan Prosedur Statistika Suatu Pendekatan Biometrik. Jakarta: Gramedia Pustaka Utama. 139-148.
- Suprihati E, Lastuti NDR, Suwanti LT, 1998. Seroepidemiologi Toxoplasmosis pada Kambing yang Dijual sebagai Sate Kambing di Kotamadya Surabaya. *Media Ked. Hewan*, 14: 172-178.
- Suwanti LT, Mufasirin, 2004. Ekspresi Interferon-Gamma (IFN- γ) pada Mencit Bunting Yang diinfeksi *Toxoplasma gondii*. Surabaya: Lemlit Unair.
- Suwanti LT, Suprihati E, Mufasirin. 2003. Deteksi Kista Jaringan *Toxoplasma gondii* pada beberapa organ ayam. Surabaya: Lemlit Unair.

- Thouvenin M, Candolfi E, Villard O, Kien T, 1997. Exploration of immune response in a murine model of congenital toxoplasmosis. *Ann. Biol. Clin.*, 55:460-464
- Thornberry NA, Lazebnik Y, 1998. Caspase: Enemies Within. *Science*, 281: 1312-1316.
- Ugglå A, Sjoland L, Dubey JP, 1987. Immunohistochemical diagnosis of toxoplasmosis in fetuses and fetal membranes of sheep. *Am J Vet Res.* 48:348-351. (Abstract).
- Velge-Roussel F, Marcelo P, Lepage AC, Buzoni-Gatel D, Bout DT, 2000. Intranasal Immunization with *Toxoplasma gondii* SAG1 Induces Protective Cells into Both NALT and GALT Compartments. *I.A.I.*, 68: 969-972.
- Vercammen M, Scorza T, Huygen K, De Braekeleer J, Diet R, Jacobs D, Saman E, Verschueren H, 2000. DNA Vaccination with Genes Encoding *Toxoplasma gondii* Antigens GRA1, GRA7, and ROP2 Induces Partially Protective Immunity against Lethal Challenge in Mice *Infect. and Immun.* 68: 38-45.
- Viganò P, Ranieri S, 2000. The implantation of the embryo: T helper 2-type cytokines and natural immunity as favouring factors at the maternal-fetal interface. Document online Ferti_Net <http://www.ferti.net/fertimagazine/hottopic/2000-06-02-files/image33.jpg>. diakses tanggal 05-10-2002 jam 21.56.
- Vince GS, Johnson PM, 2000. Leucocyte populations and cytokine regulation in human uteroplacental tissues. *Biochem. Soc. Trans.*, 28, 191-195.
- Wallon M, Liou C, Garner P, Peyron F, 1999. Congenital Toxoplasmosis: Systematic Review of Evidence of Efficacy of Treatment in Pregnancy. *BMJ*, 318. 1511-1514.
- Wegmann TG, Lin H, Guilbert L, Mosmann TR, 1993. Bidirectional cytokine interactions in the maternal-fetal relationship: Is successful pregnancy a TH2 phenomenon? *Immunol. Today*, 14:353-356.
- Wei S, Marches F, Borvak J, Zou W, Channon J, White M, Radke J, Cesbron-Delauw M-F, Curiel TJ, 2002. *Toxoplasma gondii*-Infected Human Myeloid Dendritic Cells Induce T-Lymphocyte Dysfunction and Contact-Dependent Apoptosis. *Infect. Immun.* 70:1750-1760.
- Weissmann J, 2003. Presumptive *Toxoplasma gondii* abortion in a sheep. *Can Vet J*, 44: 322-324
- Wilson M, Ware DA, Juranek DD, 1990. Serologic aspects of toxoplasmosis. *JAVMA*, 196. 277-280.

- Wolf BB, Green DR, 1999. Suicidal Tendencies: Apoptotic Cell Death by Caspase Family Preteinasas. *J. Biol. Chem*, 274:20049-20052.
- Wilder RL, 1998. Hormones, pregnancy, and autoimmune diseases. *Ann NY Acad Sci*, 840:45–50.
- Wyler DJ, 1990. *Modern Parasite Biology: Cellular, Immunological and Molecular Aspect*, New York: W.H. Freeman and Co.
- Yap GS, Scharon-Kersten T, Charest H, Sher A, 1998. Decreased resistance of TNF receptor p55- and p75-deficient mice to chronic toxoplasmosis despite normal activation of inducible nitric oxide synthase in vivo. *J. Immunol*, 160:1340-1345.
- Zenner L, Darcy E, 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. *Infection and Immunity*, 61:360-363.
- Zhang Y, Denkers EY, 1999. Protective role for interleukin-5 during chronic *Toxoplasma gondii* infection. *Infect. Immun*, 67:4383-4392.
- Zhu H, Shen Y, Shenk T, 1995. Human cytomegalovirus IE1 and IE2 proteins block apoptosis. *J Virol*, 69:7960-7970.



LAMPIRAN

Lampiran 1 Hasil Pemeriksaan Titer Antibodi Anti-*Toxoplasma gondii* pada Mencit Sebelum Perlakuan



BAGIAN PARASITOLOGI
FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS GADJAH MADA

Sekeloa, Yogyakarta 55281, Telp. (0274) 802488, Fax. 861196, E-mail: parasit@ugm@yahoo.com

Hasil Pemeriksaan serum mencit untuk mengetahui titer antibodi IgG dengan metode TOXC BREEN DA :

No	kode sampel	titer
1	S1	0
2	S2	0
3	S3	0
4	S4	0
5	S5	0
6	S6	0
7	S7	0
8	S8	0
9	S9	0
10	S10	0



Prof.DR.dr. Soeyoko, DTM&H.,SU.

Lampiran 2: Perhitungan Besar Sampel

Telah dilakukan penelitian pendahuluan pengamatan presentase jumlah sel desidua penghasil IFN- γ pada mencit bunting 4,5 hari yang diinfeksi dengan *T. gondii* isolat lokal Surabaya (Suwanti dan Mufasirin, 2004).

Data dan analisis hasil pengamatan

Jumlah sel penghasil IFN- γ dalam persen	
Infeksi	tidak infeksi
60,24	33,40
77,46	36,59
56,35	33,95
36,15	24,68
40,66	25,73
51,70	38,28
69,23	37,77
51,47	21,14
61,67	25,95
52,20	24,16

T-Test

Group Statistics

INFEKSI		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
IFN infeksi	Tidak	10	30,1650	6,4532	2,0407
	Infeksi	10	55,7030	12,3083	3,8922
Total		20	42,9340	16,22081	3,62708

Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
									Lower	Upper
IFN	Equal variances assumed	1.968	.178	-5.811	18	.000	-25.5380	4.3947	-34.7710	-16.3050
	Equal variances not assumed			-5.811	13.600	.000	-25.5380	4.3947	-34.9898	-16.0862

Bila dimasukkan dalam rumus (Steel dan Torrie, 1991):

$$\begin{aligned}
 d &= (25,538) : 2 = 12,769 & \text{jadi} & d^2 = 163,047361 \\
 s &= 16,22081 & \text{jadi} & s^2 = 263,1146770561 \\
 t_t &= t_{(0,025 \text{ db } 18)} = 2,101 & \text{jadi} & t^2 = 4,414201
 \end{aligned}$$

$$n = \frac{t^2 s^2}{d^2} = \frac{(4,414201)(263,1146770561)}{163,047361} = 7,123$$

Jadi $n = 7,123$ dan dibulatkan ke atas menjadi 8 sehingga dalam penelitian yang sesungguhnya digunakan besar sampel 8.

Lampiran 3. DATA

1. Data Jumlah Takizoit *T. gondii* dalam Cairan Peritoneal Mencit Terinfeksi Pada Umur Kebuntingan Minggu Pertama, Kedua dan Ketiga.

Subyek	Jumlah Takizoit <i>T. gondii</i> dalam Cairan Peritoneal (dalam 10^8)		
	Minggu I	Minggu II	Minggu III
1	2.90	5.40	5.55
2	4.24	3.45	6.65
3	4.03	6.33	4.68
4	3.85	5.36	6.88
5	3.19	5.82	6.65
6	3.75	5.55	5.86
7	3.48	4.95	5.68
8	2.90	4.34	5.88

2. Data Indeks apoptosis, Persentase limfosit Desidua Penghasil IFN- γ , Persentase makrofag Desidua Penghasil TNF- α , Persentase Sel Trofoblas yang mengekspresikan Fas dan TNFR1

Variabel	Umur Kebuntingan Mencit					
	Minggu I		Minggu II		Minggu III	
	Tidak Infeksi	Infeksi	Tidak Infeksi	Infeksi	Tidak Infeksi	Infeksi
Indeks apoptosis	13.44	47.83	11.41	51.82	31.68	59.69
	6.07	35.56	10.77	42.18	35.03	58.65
	7.67	31.84	13.69	47.55	33.72	60.39
	8.26	45.94	12.70	53.09	45.38	57.40
	12.88	41.60	5.88	54.35	34.53	56.18
	8.45	42.91	9.16	45.21	22.03	58.99
	8.93	37.74	10.41	49.72	28.29	55.13
	8.95	38.11	7.52	48.96	29.00	58.18
Persentase limfosit Desidua Penghasil IFN- γ	31.31	44.49	27.08	50.08	17.63	45.66
	30.02	55.48	33.04	35.56	17.84	46.52
	27.24	48.77	29.58	32.50	10.63	57.03
	46.23	48.66	28.54	40.43	17.97	41.82
	32.64	50.66	23.23	41.20	17.68	42.97
	25.35	42.18	26.42	33.48	15.79	49.43
	31.28	46.72	27.28	50.09	17.97	51.33
	32.31	48.14	26.23	31.21	18.44	51.75

Persentase makrofag Desidua Penghasil TNF- α	35.25	34.33	35.60	27.39	12.03	44.14
	26.68	37.45	9.47	35.67	22.25	25.97
	21.86	34.33	13.28	26.78	11.94	43.27
	26.77	48.55	4.07	23.30	13.59	20.45
	18.52	33.41	14.37	35.10	3.46	25.80
	18.91	37.98	10.72	26.10	3.77	34.11
	22.22	29.05	11.11	38.19	13.61	20.93
	21.73	29.65	14.31	31.27	4.45	26.77
Persentase Sel Trofoblas yang mengekspresikan Fas	4.14	47.94	9.01	51.22	7.97	47.69
	3.40	39.26	4.75	41.85	5.35	28.51
	2.73	42.47	8.55	55.49	13.42	35.13
	6.04	16.79	4.19	45.42	14.35	35.78
	2.40	16.31	4.73	19.02	13.86	44.98
	4.06	15.17	4.43	37.87	13.47	48.86
	1.62	19.13	2.87	44.98	7.37	47.58
	4.82	19.77	4.44	12.20	17.31	43.01
Persentase Sel Trofoblas yang mengekspresikan TNFRI	13.96	37.62	7.02	27.41	16.13	50.54
	12.98	37.66	2.94	27.94	7.13	42.06
	14.01	17.21	12.32	46.33	14.59	34.07
	3.20	42.00	17.22	31.10	37.54	20.40
	9.87	35.06	5.77	24.54	4.79	31.11
	9.89	34.84	36.98	45.41	7.85	22.27
	9.59	32.98	13.21	48.13	11.47	32.53
	9.73	42.71	16.03	31.43	12.27	35.15

Lampiran 4. Perhitungan Uji Beda Jumlah Takizoit *T. gondii* dalam Cairan Peritoneal Mencit

Univariate Analysis of Variance

Between-Subjects Factors

	Value Label	N
Umur Kebuntingan 1	Umur Kebuntingan Minggu I	8
2	Umur Kebuntingan Minggu II	8
3	Umur Kebuntingan Minggu III	8

Descriptive Statistics

Dependent Variable: Jumlah Takizoit dalam

Umur Kebuntingan	Mean	Std. Deviation	N
Umur Kebuntingan Minggu I	3.5413	.5076	8
Umur Kebuntingan Minggu II	5.1494	.9025	8
Umur Kebuntingan Minggu III	5.9788	.7287	8
Total	4.8898	1.2472	24

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: Jumlah Takizoit dalam

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model ^a	24.574 ^a	2	12.287	23.032	.000
Intercept	573.842	1	573.842	1075.670	.000
UMKBT	24.574	2	12.287	23.032	.000
Error	11.203	21	.533		
Total	609.619	24			
Corrected Total	35.777	23			

a. R Squared = .687 (Adjusted R Squared = .657)

Post Hoc Tests Umur Kebuntingan

Multiple Comparisons

Dependent Variable: Jumlah Takzolt dalam
LSD

(I) Umur Kebuntingan	(J) Umur Kebuntingan	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence interval	
					Lower Bound	Upper Bound
Umur Kebuntingan Minggu I	Umur Kebuntingan Minggu II	-1.6081*	.3652	.000	-2.3676	-.8487
	Umur Kebuntingan Minggu III	-2.4375*	.3652	.000	-3.1970	-1.6780
Umur Kebuntingan Minggu II	Umur Kebuntingan Minggu I	1.6081*	.3652	.000	.8487	2.3676
	Umur Kebuntingan Minggu III	-.8294*	.3652	.034	-1.5888	-6.9907E-02
Umur Kebuntingan Minggu III	Umur Kebuntingan Minggu I	2.4375*	.3652	.000	1.6780	3.1970
	Umur Kebuntingan Minggu II	.8294*	.3652	.034	6.991E-02	1.5888

Based on observed means.

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

**Lampiran 5. Perhitungan Multivariat Uji Beda Respon Inflamasi Plasenta
Pengaruh Infeksi *T. gondii***

General Linear Model

Between-Subjects Factors

		Value Label	N
Perlakuan	1	tidak diinfeksi	24
	2	diinfeksi	24
Umur Kebuntingan	1	bunting mg I	16
	2	bunting mg II	16
	3	bunting mg III	16

Descriptive Statistics

	perlakuan	umur kebuntingan	Mean	Std. Deviation	N
indeks apoptosis trofoblas	tidak diinfeksi	bunting mg I	9,3310	2,5384	8
		bunting mg II	10,1932	2,5966	8
		bunting mg III	26,3613	12,6587	8
		Total	15,2951	10,8076	24
	diinfeksi	bunting mg I	40,1935	5,3750	8
		bunting mg II	49,2348	4,0939	8
		bunting mg III	58,0754	1,7676	8
		Total	49,1679	8,3939	24
	Total	bunting mg I	24,7623	16,4465	16
		bunting mg II	29,7140	20,4312	16
		bunting mg III	42,2183	18,5593	16
		Total	32,2315	19,6108	48
% IFN- γ	tidak diinfeksi	bunting mg I	32,0465	6,2645	8
		bunting mg II	27,6747	2,8558	8
		bunting mg III	16,7444	2,5917	8
		Total	25,4885	7,7257	24
	diinfeksi	bunting mg I	48,1360	3,9952	8
		bunting mg II	39,3210	7,5328	8
		bunting mg III	48,3132	5,0580	8
		Total	45,2567	6,9499	24
	Total	bunting mg I	40,0913	9,7363	16
		bunting mg II	33,4978	8,1521	16
		bunting mg III	32,5288	16,7580	16
		Total	35,3726	12,3539	48

% TNF- α	tidak diinfeksi	bunting mg I	23,9919	5,4809	8
		bunting mg II	14,1163	9,2985	8
		bunting mg III	10,6378	6,4695	8
		Total	16,2487	9,0323	24
diinfeksi		bunting mg I	35,5953	6,1283	8
		bunting mg II	30,4745	5,3770	8
		bunting mg III	30,1796	9,3386	8
		Total	32,0831	7,2954	24
Total		bunting mg I	29,7936	8,2127	16
		bunting mg II	22,2954	11,1893	16
		bunting mg III	20,4087	12,7304	16
		Total	24,1659	11,4011	48
% Fas	tidak diinfeksi	bunting mg I	3,6501	1,4171	8
		bunting mg II	5,3725	2,1884	8
		bunting mg III	11,6386	4,1793	8
		Total	6,8871	4,4362	24
diinfeksi		bunting mg I	27,1051	13,6287	8
		bunting mg II	38,5041	15,2275	8
		bunting mg III	41,4418	7,4234	8
		Total	35,6837	13,5562	24
Total		bunting mg I	15,3776	15,3075	16
		bunting mg II	21,9383	20,0790	16
		bunting mg III	26,5402	16,4539	16
		Total	21,2854	17,6432	48
% TNFR-1	tidak diinfeksi	bunting mg I	10,4028	3,5033	8
		bunting mg II	13,9368	10,5864	8
		bunting mg III	13,9701	10,2706	8
		Total	12,7699	8,5365	24
diinfeksi		bunting mg I	35,0120	7,9563	8
		bunting mg II	35,2846	9,6598	8
		bunting mg III	33,5171	9,7908	8
		Total	34,6046	8,8017	24
Total		bunting mg I	22,7074	14,0273	16
		bunting mg II	24,6107	14,7436	16
		bunting mg III	23,7436	13,9947	16
		Total	23,6872	13,9748	48

Multivariate Tests

Effect		Value	F	Hypothesis df	Error df	Sig.
Intercept	Pillai's Trace	,990	728,090	5,000	38,000	,000
	Wilks' Lambda	,010	728,090	5,000	38,000	,000
	Hotelling's Trace	95,801	728,090	5,000	38,000	,000
	Roy's Largest Root	95,801	728,090	5,000	38,000	,000
INFEKSI	Pillai's Trace	,940	119,762	5,000	38,000	,000
	Wilks' Lambda	,060	119,762	5,000	38,000	,000
	Hotelling's Trace	15,758	119,762	5,000	38,000	,000
	Roy's Largest Root	15,758	119,762	5,000	38,000	,000
BUNTING	Pillai's Trace	,917	6,604	10,000	78,000	,000
	Wilks' Lambda	,217	8,726	10,000	76,000	,000
	Hotelling's Trace	2,997	11,091	10,000	74,000	,000
	Roy's Largest Root	2,775	21,646	5,000	39,000	,000
INFEKSI * BUNTING	Pillai's Trace	,648	3,740	10,000	78,000	,000
	Wilks' Lambda	,431	3,970	10,000	76,000	,000
	Hotelling's Trace	1,133	4,192	10,000	74,000	,000
	Roy's Largest Root	,936	7,299	5,000	39,000	,000

a Exact statistic

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

c Design: Intercept+INFEKSI+BUNTING+INFEKSI * BUNTING

Tests of Between-Subjects Effects

Source	Dependent Variable	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	indeks apoptosis trofoblas	16519,929	5	3303,986	89,215	,000
	% IFN- γ	6106,261	5	1221,252	48,079	,000
	% TNF- α	3925,021	5	785,004	15,095	,000
	% Fas	11151,354	5	2230,271	26,925	,000
	% TNFR-1	5802,782	5	1160,556	14,438	,000
Intercept	indeks apoptosis trofoblas	49865,786	1	49865,786	1346,483	,000
	% IFN- γ	60058,713	1	60058,713	2364,440	,000
	% TNF- α	28031,535	1	28031,535	539,007	,000
	% Fas	21747,204	1	21747,204	262,547	,000
	% TNFR-1	26932,081	1	26932,081	335,041	,000
INFEKSI	indeks apoptosis trofoblas	13768,355	1	13768,355	371,775	,000

	% IFN- γ	4689,373	1	4689,373	184,615	,000
	% TNF- α	3008,764	1	3008,764	57,854	,000
	% Fas	9950,950	1	9950,950	120,135	,000
	% TNFR-1	5721,054	1	5721,054	71,171	,000
BUNTING	indeks apoptosis trofoblas	2589,821	2	1294,911	34,965	,000
	% IFN- γ	541,885	2	270,943	10,667	,000
	% TNF- α	788,576	2	394,288	7,582	,002
	% Fas	1007,048	2	503,524	6,079	,005
	% TNFR-1	29,057	2	14,528	,181	,835
INFEKSI * BUNTING	indeks apoptosis trofoblas	161,753	2	80,876	2,184	,125
	% IFN- γ	875,003	2	437,501	17,224	,000
	% TNF- α	127,681	2	63,841	1,228	,303
	% Fas	193,356	2	96,678	1,167	,321
	% TNFR-1	52,672	2	26,336	,328	,722
Error	indeks apoptosis trofoblas	1555,433	42	37,034		
	% IFN- γ	1066,834	42	25,401		
	% TNF- α	2184,246	42	52,006		
	% Fas	3478,933	42	82,832		
	% TNFR-1	3376,149	42	80,385		
Total	indeks apoptosis trofoblas	67941,147	48			
	% IFN- γ	67231,808	48			
	% TNF- α	34140,802	48			
	% Fas	36377,491	48			
	% TNFR-1	36111,013	48			
Corrected Total	indeks apoptosis trofoblas	18075,362	47			
	% IFN- γ	7173,095	47			
	% TNF- α	6109,267	47			
	% Fas	14630,287	47			
	% TNFR-1	9178,931	47			

a R Squared = ,914 (Adjusted R Squared = ,904)

b R Squared = ,851 (Adjusted R Squared = ,834)

c R Squared = ,642 (Adjusted R Squared = ,600)

d R Squared = ,762 (Adjusted R Squared = ,734)

e R Squared = ,632 (Adjusted R Squared = ,588)

Multiple Comparisons

				Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidenc e Interval			
Dependent Variable		(J) KELOMPOK	(J) KELOMPOK				Lower Bound	Upper Bound		
indeks apoptosis trofoblas	LSD	tidak infeksi mgI	tidak infeksi mgII	-.8621	2.1149	.686	-5.1302	3.4059		
			tidak infeksi mgIII	-23.1275	2.1149	.000	-27.3955	-18.8594		
			infeksi mg I	-30.8625	2.1149	.000	-35.1306	-26.5945		
					infeksi mg II	-39.7784	2.1149	.000	-44.0465	-35.5104
					infeksi mg III	-48.7444	2.1149	.000	-53.0124	-44.4763
				tidak infeksi mgII	tidak infeksi mgI	.8621	2.1149	.686	-3.4059	5.1302
					tidak infeksi mgIII	-22.2653	2.1149	.000	-26.5334	-17.9973
					infeksi mg I	-30.0004	2.1149	.000	-34.2684	-25.7323
					infeksi mg II	-38.9163	2.1149	.000	-43.1843	-34.6482
					infeksi mg III	-47.8822	2.1149	.000	-52.1503	-43.6142
				tidak infeksi mgIII	tidak infeksi mgI	23.1275	2.1149	.000	18.8594	27.3955
					tidak infeksi mgII	22.2653	2.1149	.000	17.9973	26.5334
					infeksi mg I	-7.7350	2.1149	.001	-12.0031	-3.4670
					infeksi mg II	-16.6509	2.1149	.000	-20.9190	-12.3829
					infeksi mg III	-25.6169	2.1149	.000	-29.8849	-21.3488
				infeksi mg I	tidak infeksi mgI	30.8625	2.1149	.000	26.5945	35.1306
					tidak infeksi mgII	30.0004	2.1149	.000	25.7323	34.2684
					tidak infeksi mgIII	7.7350	2.1149	.001	3.4670	12.0031
					infeksi mg II	-8.9159	2.1149	.000	-13.1840	-4.6478
					infeksi mg III	-17.8819	2.1149	.000	-22.1499	-13.6138
				infeksi mg II	tidak infeksi mgI	39.7784	2.1149	.000	35.5104	44.0465
					tidak infeksi mgII	38.9163	2.1149	.000	34.6482	43.1843
					Tidak infeksi mgIII	16.6509	2.1149	.000	12.3829	20.9190
					infeksi mg I	8.9159	2.1149	.000	4.6478	13.1840
					infeksi mg III	-8.9660	2.1149	.000	-13.2340	-4.6979
				infeksi mg III	tidak infeksi mgI	48.7444	2.1149	.000	44.4763	53.0124
					tidak infeksi mgII	47.8822	2.1149	.000	43.6142	52.1503
			tidak infeksi	25.6169	2.1149	.000	21.3488	29.8849		

			mgIII					
			infeksi mg I	17.8819	2.1149	.000	13.6138	22.1499
			infeksi mg II	8.9660	2.1149	.000	4.6979	13.2340
% IFN- γ	LSD	tidak infeksi mgI	tidak infeksi mgII	4.6366	2.7831	.103	-9800	10.2531
			tidak infeksi mgIII	16.2710	2.7831	.000	10.6544	21.8875
			infeksi mg I	-16.1175	2.7831	.000	-21.7341	-10.5009
			infeksi mg II	-6.9685	2.7831	.016	-12.5850	-1.3519
			infeksi mg III	-14.6768	2.7831	.000	-20.2933	-9.0602
		tidak infeksi mgII	tidak infeksi mgI	-4.6366	2.7831	.103	-10.2531	9800
			tidak infeksi mgIII	11.6344	2.7831	.000	6.0179	17.2510
			infeksi mg I	-20.7541	2.7831	.000	-26.3706	-15.1375
			infeksi mg II	-11.6051	2.7831	.000	-17.2216	-5.9885
			infeksi mg III	-19.3133	2.7831	.000	-24.9299	-13.6968
		tidak infeksi mgIII	Tidak infeksi mgI	-16.2710	2.7831	.000	-21.8875	-10.6544
			Tidak infeksi mgII	-11.6344	2.7831	.000	-17.2510	-6.0179
			Infeksi mg I	-32.3885	2.7831	.000	-38.0050	-26.7719
			Infeksi mg II	-23.2395	2.7831	.000	-28.8560	-17.6229
			Infeksi mg III	-30.9477	2.7831	.000	-36.5643	-25.3312
		infeksi mg I	Tidak infeksi mgI	16.1175	2.7831	.000	10.5009	21.7341
			tidak infeksi mgII	20.7541	2.7831	.000	15.1375	26.3706
			tidak infeksi mgIII	32.3885	2.7831	.000	26.7719	38.0050
			infeksi mg II	9.1490	2.7831	.002	3.5325	14.7656
			infeksi mg III	1.4408	2.7831	.607	-4.1758	7.0573
		infeksi mg II	tidak infeksi mgI	6.9685	2.7831	.016	1.3519	12.5850
			tidak infeksi mgII	11.6051	2.7831	.000	5.9885	17.2216
			tidak infeksi mgIII	23.2395	2.7831	.000	17.6229	28.8560
			infeksi mg I	-9.1490	2.7831	.002	-14.7656	-3.5325
			infeksi mg III	-7.7083	2.7831	.008	-13.3248	-2.0917
		infeksi mg III	tidak infeksi mgI	14.6768	2.7831	.000	9.0602	20.2933
			tidak infeksi mgII	19.3133	2.7831	.000	13.6968	24.9299
			tidak infeksi mgIII	30.9477	2.7831	.000	25.3312	36.5643
			infeksi mg I	-1.4408	2.7831	.607	-7.0573	4.1758
			infeksi mg II	7.7083	2.7831	.008	2.0917	13.3248
% TNF- α	LSD	tidak infeksi mgI	tidak infeksi mgII	11.5459	4.2271	.009	3.0152	20.0766
			tidak infeksi	12.2185	4.2271	.006	3.6878	20.7492

			mgIII					
			infeksi mg I	-16.0251	4.2271	.000	-24.5558	-7.4944
			infeksi mg II	-1.6068	4.2271	.706	-10.1375	6.9239
			infeksi mg III	-4.3335	4.2271	.311	-12.8642	4.1972
		tidak infeksi mgII	tidak infeksi mgI	-11.5459	4.2271	.009	-20.0766	-3.0152
			tidak infeksi mgIII	.6726	4.2271	.874	-7.8581	9.2033
			infeksi mg I	-27.5710	4.2271	.000	-36.1017	-19.0403
			infeksi mg II	-13.1527	4.2271	.003	-21.6834	-4.6220
			infeksi mg III	-15.8794	4.2271	.001	-24.4101	-7.3487
		tidak infeksi mgIII	tidak infeksi mgI	-12.2185	4.2271	.006	-20.7492	-3.6878
			tidak infeksi mgII	-.6726	4.2271	.874	-9.2033	7.8581
			infeksi mg I	-28.2436	4.2271	.000	-36.7743	-19.7129
			infeksi mg II	-13.8253	4.2271	.002	-22.3560	-5.2946
			infeksi mg III	-16.5520	4.2271	.000	-25.0827	-8.0213
		infeksi mg I	tidak infeksi mgI	16.0251	4.2271	.000	7.4944	24.5558
			tidak infeksi mgII	27.5710	4.2271	.000	19.0403	36.1017
			tidak infeksi mgIII	28.2436	4.2271	.000	19.7129	36.7743
			infeksi mg II	14.4183	4.2271	.001	5.8876	22.9490
			infeksi mg III	11.6916	4.2271	.008	3.1609	20.2223
		infeksi mg II	tidak infeksi mgI	1.6068	4.2271	.706	-6.9239	10.1375
			tidak infeksi mgII	13.1527	4.2271	.003	4.6220	21.6834
			tidak infeksi mgIII	13.8253	4.2271	.002	5.2946	22.3560
			infeksi mg I	-14.4183	4.2271	.001	-22.9490	-5.8876
			infeksi mg III	-2.7267	4.2271	.522	-11.2574	5.8040
		infeksi mg III	tidak infeksi mgI	4.3335	4.2271	.311	-4.1972	12.8642
			tidak infeksi mgII	15.8794	4.2271	.001	7.3487	24.4101
			tidak infeksi mgIII	16.5520	4.2271	.000	8.0213	25.0827
			infeksi mg I	-11.6916	4.2271	.008	-20.2223	-3.1609
			infeksi mg II	2.7267	4.2271	.522	-5.8040	11.2574
% Fas	LSD	tidak infeksi mgI	tidak infeksi mgII	-1.7223	4.9230	.728	-11.6574	8.2127
			tidak infeksi mgIII	-7.9916	4.9230	.112	-17.9267	1.9434
			infeksi mg I	-23.4550	4.9230	.000	-33.3900	-13.5199
			infeksi mg II	-34.8540	4.9230	.000	-44.7891	-24.9190
			infeksi mg III	-35.0089	4.9230	.000	-44.9439	-25.0738
		tidak infeksi mgII	tidak infeksi mgI	1.7223	4.9230	.728	-8.2127	11.6574

			tidak infeksi mgIII	-6.2693	4.9230	.210	-16.2043	3.6658
			infeksi mg I	-21.7327	4.9230	.000	-31.6677	-11.7976
			infeksi mg II	-33.1317	4.9230	.000	-43.0667	-23.1966
			infeksi mg III	-33.2866	4.9230	.000	-43.2216	-23.3515
		tidak infeksi mgII	tidak infeksi mgI	7.9916	4.9230	.112	-1.9434	17.9267
			tidak infeksi mgII	6.2693	4.9230	.210	-3.6658	16.2043
			infeksi mg I	-15.4634	4.9230	.003	-25.3984	-5.5283
			infeksi mg II	-26.8624	4.9230	.000	-36.7975	-16.9273
			infeksi mg III	-27.0173	4.9230	.000	-36.9523	-17.0822
		infeksi mg I	tidak infeksi mgI	23.4550	4.9230	.000	13.5199	33.3900
			tidak infeksi mgII	21.7327	4.9230	.000	11.7976	31.6677
			tidak infeksi mgIII	15.4634	4.9230	.003	5.5283	25.3984
			infeksi mg II	-11.3990	4.9230	.026	-21.3341	-1.4640
			infeksi mg III	-11.5539	4.9230	.024	-21.4889	-1.6188
		infeksi mg II	tidak infeksi mgI	34.8540	4.9230	.000	24.9190	44.7891
			tidak infeksi mgII	33.1317	4.9230	.000	23.1966	43.0667
			tidak infeksi mgII	26.8624	4.9230	.000	16.9273	36.7975
			infeksi mg I	11.3990	4.9230	.026	1.4640	21.3341
			infeksi mg III	-.1549	4.9230	.975	-10.0899	9.7802
		infeksi mg III	tidak infeksi mgI	35.0089	4.9230	.000	25.0738	44.9439
			tidak infeksi mgII	33.2866	4.9230	.000	23.3515	43.2216
			tidak infeksi mgIII	27.0173	4.9230	.000	17.0822	36.9523
			infeksi mg I	11.5539	4.9230	.024	1.6188	21.4889
			infeksi mg II	.1549	4.9230	.975	-9.7802	10.0899
% TNFR-1	LSD	tidak infeksi mgI	tidak infeksi mgI	-3.5340	5.6337	.534	-14.9033	7.8353
			tidak infeksi mgII	-3.5672	5.6337	.530	-14.9365	7.8021
			infeksi mg I	-25.1418	5.6337	.000	-36.5111	-13.7725
			infeksi mg II	-19.3293	5.6337	.001	-30.6986	-7.9600
			infeksi mg III	-15.1605	5.6337	.010	-26.5298	-3.7912
		tidak infeksi mgII	tidak infeksi mgI	3.5340	5.6337	.534	-7.8353	14.9033
			tidak infeksi mgIII	-3.3275E-02	5.6337	.995	-11.4026	11.3360
			infeksi mg I	-21.6079	5.6337	.000	-32.9772	-10.2386
			infeksi mg II	-15.7953	5.6337	.008	-27.1646	-4.4260
			infeksi mg III	-11.6265	5.6337	.045	-22.9958	-2.572
		tidak infeksi	tidak infeksi	3.5672	5.6337	.530	-7.8021	14.9365

		mgIII	mgI					
			tidak infeksi mgII	3.327E-02	5.6337	.995	-11.3360	11.4026
			infeksi mg I	-21.5746	5.6337	.000	-32.9439	-10.2053
			infeksi mg II	-15.7621	5.6337	.008	-27.1314	-4.3928
			infeksi mg III	-11.5933	5.6337	.046	-22.9625	-.2240
		infeksi mg I	tidak infeksi mgI	25.1418	5.6337	.000	13.7725	36.5111
			tidak infeksi mgII	21.6079	5.6337	.000	10.2386	32.9772
			tidak infeksi mgIII	21.5746	5.6337	.000	10.2053	32.9439
			infeksi mg II	5.8125	5.6337	.308	-5.5568	17.1818
			infeksi mg III	9.9813	5.6337	.084	-1.3880	21.3506
		infeksi mg II	tidak infeksi mgI	19.3293	5.6337	.001	7.9600	30.6986
			tidak infeksi mgII	15.7953	5.6337	.008	4.4260	27.1646
			tidak infeksi mgIII	15.7621	5.6337	.008	4.3928	27.1314
			infeksi mg I	-5.8125	5.6337	.308	-17.1818	5.5568
			infeksi mg III	4.1688	5.6337	.463	-7.2005	15.5381
		infeksi mg III	tidak infeksi mgI	15.1605	5.6337	.010	3.7912	26.5298
			tidak infeksi mgII	11.6265	5.6337	.045	.2572	22.9958
			tidak infeksi mgIII	11.5933	5.6337	.046	.2240	22.9625
			infeksi mg I	-9.9813	5.6337	.084	-21.3506	1.3880
			infeksi mg II	-4.1688	5.6337	.463	-15.5381	7.2005

Based on observed means.

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

Lampiran 6. Analisis Diskriminan

1. Respon Inflamasi Plasenta Mencit Yang Diinfeksi *T. gondii* Pada Kebuntingan Minggu Pertama

Discriminant

Analysis Case Processing Summary

Unweighted Cases		N	Percent
Valid		16	100.0
Excluded	Missing or out-of-range group codes	0	.0
	At least one missing discriminating variable	0	.0
	Both missing or out-of-range group codes and at least one missing discriminating variable	0	.0
	Total	0	0
Total		16	100.0

Group Statistics

perlakuan		Mean	Std. Deviation	Valid N (listwise)	
				Unweighted	Weighted
tidak diinfeksi	indeks apoptosis trofoblas	9.3310	2.5384	8	8.000
	% IFN-gama	32.0485	6.2645	8	8.000
	% TNF-alfa	23.9919	5.4809	8	8.000
	% FAS	3.6501	1.4171	8	8.000
	% TNFR-1	10.4028	3.5033	8	8.000
diinfeksi	indeks apoptosis trofoblas	40.1935	5.3750	8	8.000
	% IFN-gama	48.1360	3.9952	8	8.000
	% TNF-alfa	35.5953	6.1283	8	8.000
	% FAS	27.1051	13.6287	8	8.000
	% TNFR-1	35.0120	7.9563	8	8.000
Total	indeks apoptosis trofoblas	24.7623	16.4465	16	16.000
	% IFN-gama	40.0913	9.7363	16	16.000
	% TNF-alfa	29.7936	8.2127	16	16.000
	% FAS	15.3776	15.3075	16	16.000
	% TNFR-1	22.7074	14.0273	16	16.000

Tests of Equality of Group Means

	Wilks' Lambda	F	df1	df2	Sig.
indeks apoptosis trofoblas	.061	215.655	1	14	.000
% IFN-gama	.272	37.514	1	14	.000
% TNF-alfa	.468	15.934	1	14	.001
% FAS	.374	23.441	1	14	.000
% TNFR-1	.179	64.106	1	14	.000

Pooled Within-Groups Matrices

		indeks apoptosis trofoblas	% IFN-gama	% TNF-alfa	% FAS	% TNFR-1
Correlation	indeks apoptosis trofoblas	1.000	-.222	.360	-.176	.531
	% IFN-gama	-.222	1.000	.190	.154	-.260
	% TNF-alfa	.360	.190	1.000	-.059	.219
	% FAS	-.176	.154	-.059	1.000	-.379
	% TNFR-1	.531	-.260	.219	-.379	1.000

Analysis 1

Box's Test of Equality of Covariance Matrices

Log Determinants

perlakuan	Rank	Log Determinant
tidak diinfeksi	2	5.531
diinfeksi	2	5.862
Pooled within-groups	2	6.139

The ranks and natural logarithms of determinants printed are those of the group covariance matrices.

Test Results

Box's M		6.194
F	Approx.	1.745
	df1	3
	df2	35280.000
	Sig.	.156

Tests null hypothesis of equal population covariance matrices.

Stepwise Statistics

Variables Entered/Removed^{a,b,c,d}

Step	Entered	Wilks' Lambda							
		Statistic	df1	df2	df3	Exact F			
						Statistic	df1	df2	Sig.
1	indeks apoptosis trofoblas	.061	1	1	14.0	215.655	1	14.00	.000
2	% IFN-gama	.043	2	1	14.0	143.168	2	13.00	.000

At each step, the variable that minimizes the overall Wilks' Lambda is entered.

- a. Maximum number of steps is 10.
- b. Maximum significance of F to enter is .05.
- c. Minimum significance of F to remove is .10.
- d. F level, tolerance, or VIF insufficient for further computation.

Variables in the Analysis

Step		Tolerance	Sig. of F to Remove	Wilks' Lambda
1	indeks apoptosis trofoblas	1.000	.000	
2	indeks apoptosis trofoblas	.951	.000	.272
	% IFN-gama	.951	.039	.061

Variables Not in the Analysis

Step		Tolerance	Min. Tolerance	Sig. of F to Enter	Wilks' Lambda
0	indeks apoptosis trofoblas	1.000	1.000	.000	.061
	% IFN-gama	1.000	1.000	.000	.272
	% TNF-alfa	1.000	1.000	.001	.468
	% FAS	1.000	1.000	.000	.374
	% TNFR-1	1.000	1.000	.000	.179
1	% IFN-gama	.951	.951	.039	.043
	% TNF-alfa	.870	.870	.746	.060
	% FAS	.969	.969	.096	.049
	% TNFR-1	.718	.718	.955	.061
2	% TNF-alfa	.794	.763	.408	.041
	% FAS	.955	.930	.238	.038
	% TNFR-1	.697	.697	.717	.043

Wilks' Lambda

Step	Number of Variables	Lambda	df1	df2	df3	Exact F			
						Statistic	df1	df2	Sig.
1	1	.061	1	1	14	215.655	1	14.0	.000
2	2	.043	2	1	14	143.168	2	13.0	.000

Summary of Canonical Discriminant Functions

Eigenvalues

Function	Eigenvalue	% of Variance	Cumulative %	Canonical Correlation
1	22.026 ^a	100.0	100.0	.978

- a. First 1 canonical discriminant functions were used in the analysis

Wilks' Lambda

Test of Function(s)	Wilks' Lambda	Chi-square	df	Sig.
1	.043	40.776	2	.000

Standardized Canonical Discriminant Function Coefficients

	Function
	1
indeks apoptosis trofoblas	.961
% IFN-gama	.562

Structure Matrix

	Function
	1
indeks apoptosis trofoblas	.836
% TNF-alfa ^a	.453
% TNFR- β	.364
% IFN-gama	.349
% FAS ^a	-.083

Pooled within-groups correlations between discriminating variables and standardized canonical discriminant functions. Variables ordered by absolute size of correlation within function.

^a This variable not used in the analysis

Canonical Discriminant Function Coefficients

	Function
	1
indeks apoptosis trofoblas	.229
% IFN-gama	.107
(Constant)	-9.954

Unstandardized coefficients

Functions at Group Centroids

	Function
perlakuan	1
tidak diinfeksi	-4.390
diinfeksi	4.390

Unstandardized canonical discriminant functions evaluated at group means

Classification Statistics**Classification Processing Summary**

Processed		16
Excluded	Missing or out-of-range group codes	0
	At least one missing discriminating variable	0
Used in Output		16

Prior Probabilities for Groups

perlakuan	Prior	Cases Used in Analysis	
		Unweighted	Weighted
tidak diinfeksi	.500	8	8.000
diinfeksi	.500	8	8.000
Total	1.000	16	16.000

Classification Function Coefficients

	perlakuan	
	tidak diinfeksi	diinfeksi
indeks apoptosis trofoblas	.895	2.903
% IFN-gama	1.320	2.260
(Constant)	-26.019	-113.418

Fisher's linear discriminant functions

Classification Results ^{a, c}

	perlakuan	Predicted Group Membership		Total	
		tidak diinfeksi	diinfeksi		
Original	Count	tidak diinfeksi	8	0	8
		diinfeksi	0	8	8
	%	tidak diinfeksi	100.0	.0	100.0
		diinfeksi	.0	100.0	100.0
Cross-validated ^a	Count	tidak diinfeksi	8	0	8
		diinfeksi	0	8	8
	%	tidak diinfeksi	100.0	.0	100.0
		diinfeksi	.0	100.0	100.0

- a. Cross validation is done only for those cases in the analysis. In cross validation, each case is classified by the functions derived from all cases other than that case.
- b. 100.0% of original grouped cases correctly classified.
- c. 100.0% of cross-validated grouped cases correctly classified.

Besarnya kontribusi variabel dominan

	Tidak Diinfeksi	Diinfeksi
Indek apoptosis trofoblas	8.3513	116.6818
IFN- γ	42.3014	108.7874

2. Respon Inflamasi Plasenta Mencit Yang Diinfeksi *T. gondii* Pada Kebuntingan Minggu Kedua

Discriminant

Analysis Case Processing Summary

Unweighted Cases		N	Percent
Valid		16	100.0
Excluded	Missing or out-of-range group codes	0	.0
	At least one missing discriminating variable	0	.0
	Both missing or out-of-range group codes and at least one missing discriminating variable	0	.0
	Total	0	.0
Total		16	100.0

Group Statistics

pertakuan		Mean	Std. Deviation	Valid N (listwise)	
				Unweighted	Weighted
tidak diinfeksi	indeks apoptosis trofoblas	10.1932	2.5966	8	8.000
	% IFN-gama	27.6747	2.8558	8	8.000
	% TNF-alfa	14.1163	9.2985	8	8.000
	% FAS	5.3725	2.1884	8	8.000
	% TNFR-1	13.9368	10.5864	8	8.000
diinfeksi	indeks apoptosis trofoblas	49.1094	4.0843	8	8.000
	% IFN-gama	39.3210	7.5328	8	8.000
	% TNF-alfa	30.4745	5.3770	8	8.000
	% FAS	38.5042	15.2275	8	8.000
	% TNFR-1	35.2846	9.6598	8	8.000
Total	indeks apoptosis trofoblas	29.6513	20.3664	16	16.000
	% IFN-gama	33.4979	8.1521	16	16.000
	% TNF-alfa	22.2954	11.1893	16	16.000
	% FAS	21.9383	20.0790	16	16.000
	% TNFR-1	24.6107	14.7436	16	16.000

Tests of Equality of Group Means

	Wilks' Lambda	F	df1	df2	Sig.
indeks apoptosis trofoblas	.026	517.244	1	14	.000
% IFN-gama	.456	16.720	1	14	.001
% TNF-alfa	.430	18.555	1	14	.001
% FAS	.274	37.106	1	14	.000
% TNFR-1	.441	17.751	1	14	.001

Pooled Within-Groups Matrices

		indeks apoptosis trofoblas	% IFN-gama	% TNF-alfa	% FAS	% TNFR-1
Correlation	indeks apoptosis trofoblas	1.000	.536	-.068	-.118	-.202
	% IFN-gama	.536	1.000	.052	.314	-.120
	% TNF-alfa	-.068	.052	1.000	-.079	-.213
	% FAS	-.118	.314	-.079	1.000	.245
	% TNFR-1	-.202	-.120	-.213	.245	1.000

Analysis 1

Box's Test of Equality of Covariance Matrices

Log Determinants

perlakuan	Rank	Log Determinant
tidak diinfeksi	1	1.908
diinfeksi	1	2.814
Pooled within-groups	1	2.461

The ranks and natural logarithms of determinants printed are those of the group covariance matrices.

Test Results

Box's M		1.390
F	Approx.	1.298
	df1	1
	df2	588.000
	Sig.	.255

Tests null hypothesis of equal population covariance matrices.

Stepwise Statistics

Variables Entered/Removed^{a,b,c,d}

Step	Entered	Wilks' Lambda							
		Statistic	df1	df2	df3	Exact F			
Statistic	df1					df2	Sig.		
1	indeks apoptosis trofoblas	.026	1	1	14.0	517.244	1	14.0	.000

At each step, the variable that minimizes the overall Wilks' Lambda is entered

- Maximum number of steps is 10
- Maximum significance of F to enter is .05.
- Minimum significance of F to remove is .10
- F level, tolerance, or VIF insufficient for further computation

Variables in the Analysis

Step		Tolerance	Sig. of F to Remove
1	indeks apoptosis trofoblas	1.000	.000

Variables Not in the Analysis

Step		Tolerance	Min Tolerance	Sig. of F to Enter	Wilks' Lambda
0	indeks apoptosis trofoblas	1.000	1.000	.000	.026
	% IFN-gama	1.000	1.000	.001	.456
	% TNF-alfa	1.000	1.000	.001	.430
	% FAS	1.000	1.000	.000	.274
	% TNFR-1	1.000	1.000	.001	.441
1	% IFN-gama	.713	.713	.157	.022
	% TNF-alfa	.995	.995	.376	.025
	% FAS	.986	.986	.190	.023
	% TNFR-1	.959	.959	.183	.023

Wilks' Lambda

Step	Number of Variables	Lambda	df1	df2	df3	Exact F			
						Statistic	df1	df2	Sig.
1	1	.026	1	1	14	517.244	1	14.0	2.E-12

Summary of Canonical Discriminant Functions

Eigenvalues

Function	Eigenvalue	% of Variance	Cumulative %	Canonical Correlation
1	36.946 ^a	100.0	100.0	.987

- a. First 1 canonical discriminant functions were used in the analysis

Wilks' Lambda

Test of Function(s)	Wilks' Lambda	Chi-square	df	Sig.
1	.026	49.088	1	.000

Standardized Canonical Discriminant Function Coefficients

	Function
	1
indeks apoptosis trofoblas	1.000

Structure Matrix

	Function
	1
indeks apoptosis trofoblas	1.000
% IFN-gama ^a	.536
% TNFR- β	-.202
% FAS ^a	-.118
% TNF-alfa ^a	-.068

Pooled within-groups correlations between discriminating variables and standardized canonical discriminant functions. Variables ordered by absolute size of correlation within function.

a. This variable not used in the analysis.

Canonical Discriminant Function Coefficients

	Function
	1
indeks apoptosis trofoblas	.292
(Constant)	-8.664

Unstandardized coefficients

Functions at Group Centroids

perlakuan	Function
	1
tidak diinfeksi	-5.686
diinfeksi	5.686

Unstandardized canonical discriminant functions evaluated at group means

Classification Statistics**Classification Processing Summary**

Processed		16
Excluded	Missing or out-of-range group codes	0
	At least one missing discriminating variable	0
Used in Output		16

Prior Probabilities for Groups

perlakuan	Prior	Cases Used in Analysis	
		Unweighted	Weighted
tidak diinfeksi	.500	8	8.000
diinfeksi	.500	8	8.000
Total	1.000	16	16.000

Classification Function Coefficients

	perlakuan	
	tidak diinfeksi	diinfeksi
indeks apoptosis trofoblas (Constant)	.870 -5.129	4.193 -103.654

Fisher's linear discriminant functions

Classification Results^{b,c}

	perlakuan	Predicted Group Membership		Total	
		tidak diinfeksi	diinfeksi		
Original	Count	tidak diinfeksi	8	0	8
		diinfeksi	0	8	8
	%	tidak diinfeksi	100.0	.0	100.0
		diinfeksi	.0	100.0	100.0
Cross-validated ^a	Count	tidak diinfeksi	8	0	8
		diinfeksi	0	8	8
	%	tidak diinfeksi	100.0	.0	100.0
		diinfeksi	.0	100.0	100.0

a. Cross validation is done only for those cases in the analysis. In cross validation, each case is classified by the functions derived from all cases other than that case.

b. 100.0% of original grouped cases correctly classified.

c. 100.0% of cross-validated grouped cases correctly classified

Besarnya kontribusi variabel dominan

	Indeks Apoptosis Trofoblas	
	Tidak Diinfeksi	Diinfeksi
Indeks apoptosis trofoblas	8.8681	205.9158

3. Respon Inflamasi Plasenta Mencit Yang Diinfeksi *T. gondii* Pada Kebuntingan Minggu Ketiga

Discriminant

Analysis Case Processing Summary

Unweighted Cases		N	Percent
Valid		16	100.0
Excluded	Missing or out-of-range group codes	0	.0
	At least one missing discriminating variable	0	.0
	Both missing or out-of-range group codes and at least one missing discriminating variable	0	.0
	Total	0	.0
Total		16	100.0

Group Statistics

perlakuan		Mean	Std. Deviation	Valid N (listwise)	
				Unweighted	Weighted
tidak diinfeksi	indeks apoptosis trofoblas	32.4585	6.7428	8	8.000
	% IFN-gama	16.7444	2.5917	8	8.000
	% TNF-alfa	10.6378	6.4695	8	8.000
	% FAS	11.6385	4.1793	8	8.000
	% TNFR-1	13.9701	10.2706	8	8.000
diinfeksi	indeks apoptosis trofoblas	58.0754	1.7676	8	8.000
	% IFN-gama	48.3132	5.0580	8	8.000
	% TNF-alfa	30.1796	9.3386	8	8.000
	% FAS	41.4418	7.4234	8	8.000
	% TNFR-1	33.5171	9.7908	8	8.000
Total	indeks apoptosis trofoblas	45.2669	14.0595	16	16.000
	% IFN-gama	32.5288	16.7580	16	16.000
	% TNF-alfa	20.4087	12.7304	16	16.000
	% FAS	26.5402	16.4539	16	16.000
	% TNFR-1	23.7436	13.9947	16	16.000

Variables Not in the Analysis

Step		Tolerance	Min. Tolerance	F to Enter	Wilks' Lambda
0	indeks apoptosis trofoblas	1.000	1.000	108.043	.115
	% IFN-gama	1.000	1.000	246.830	.054
	% TNF-alfa	1.000	1.000	23.671	.372
	% FAS	1.000	1.000	97.913	.125
	% TNFR-1	1.000	1.000	15.181	.480
1	indeks apoptosis trofoblas	.986	.986	3.675	.042
	% TNF-alfa	.906	.906	.000	.054
	% FAS	.999	.999	5.414	.038
	% TNFR-1	.994	.994	.364	.052
2	indeks apoptosis trofoblas	.984	.984	2.639	.031
	% TNF-alfa	.895	.895	.048	.038
	% TNFR-1	.992	.992	.154	.037

Wilks' Lambda

Step	Number of Variables	Lambda	df1	df2	df3	Exact F			
						Statistic	df1	df2	Sig.
1	1	.054	1	1	14	246.830	1	14.000	.754E-10
2	2	.038	2	1	14	165.034	2	13.000	.763E-10

Summary of Canonical Discriminant Functions

Eigenvalues

Function	Eigenvalue	% of Variance	Cumulative %	Canonical Correlation
1	25.390 ^a	100.0	100.0	.981

^a First 1 canonical discriminant functions were used in the analysis.

Wilks' Lambda

Test of Function(s)	Wilks' Lambda	Chi-square	df	Sig.
1	.038	42.549	2	.000

Standardized Canonical Discriminant Function Coefficients

	Function
	1
% IFN-gama	.852
% FAS	.553

Structure Matrix

	Function
	1
% IFN-gama	.833
% FAS	.525
% TNF alfa ^a	.197
% TNFR-1 ^a	.092
indeks apoptosis trofoblas	.077

Pooled within-groups correlations between discriminating variables and standardized canonical discriminant functions. Variables ordered by absolute size of correlation within function.

^a This variable not used in the analysis.

Canonical Discriminant Function Coefficients

	Function
	1
% IFN-gama	.212
% FAS	.092
(Constant)	-.9331

Unstandardized coefficients

Functions at Group Centroids

	Function
	1
peilakuan	1
tidak diinfeksi	-4.713
diinfeksi	4.713

Unstandardized canonical discriminant functions evaluated at group means

Classification Statistics

Prior Probabilities for Groups

perlakuan	Prior	Cases Used in Analysis	
		Unweighted	Weighted
tidak diinfeksi	.500	8	8.000
diinfeksi	.500	8	8.000
Total	1.000	16	16.000

Classification Function Coefficients

	perlakuan	
	tidak diinfeksi	diinfeksi
% IFN-gama	1.054	3.052
% FAS	.344	1.210
(Constant)	-11.519	-99.477

Fisher's linear discriminant functions

Besar kontribusi variabel dominan

	Tidak Diinfeksi	Diinfeksi
IFN- γ	17.6486	147.4517
Fas	4.0037	50.1445

Lampiran 7 Ethical Clearance



DEPARTEMEN PENDIDIKAN NASIONAL
UNIVERSITAS AIRLANGGA
LEMBAGA PENELITIAN

- | | | |
|---------------------------------------|-------------------------------------|--|
| 1. Pusat Pembangunan Regional | 5. Pusat Pengembangan Diri (595720) | 9. Pusat Kepenuhikan dan Pengembangan (595718) |
| 2. Pusat Obat Tradisional | 6. Pusat Studi Wanita (595722) | 10. Pusat Kesehatan Reproduksi |
| 3. Pusat Pengembangan Museum (595368) | 7. Pusat Olah Raga | |
| 4. Pusat Lingkungan Hidup (595718) | 8. Pusat Bioenergi | |

Kampus C Unair, Jl. Mulyorejo Surabaya 60115 Telp. (031) 595246, 595248, 595247 Fax. (031) 595256
E-mail: ipunair@cad.unair.id - http://www.geocities.com/Athens/Olympus/6223

**KOMISI ETIKA PENELITIAN
LEMBAGA PENELITIAN UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA**

**KETERANGAN KELAIKAN ETIK
(ETHICAL CLEARANCE)
NO. 008/PANEC/LEMLIT/2005**

Panitia Kelaikan Etik Penelitian Lembaga Penelitian Universitas Airlangga Surabaya, setelah mempelajari dan mengkaji secara seksama rancangan penelitian yang diusulkan, maka dengan ini menyatakan bahwa penelitian yang berjudul:

Pengaruh Infeksi *Toxoplasma Gondii* Pada Umur Kebuntingan Yang Berbeda Terhadap Apoptosis Trofoblas, Ekspresi IFN- γ , TNF α , FAS dan TNFR-1 Pada Mencit Bunting.

Peneliti Utama : drh. Lucia Tri Suwanti, MP.
Unit/Lab. Tempat Penelitian : Lab. Biokimia - Pusat Studi Bioteknologi Universitas Gajah Mada Yogyakarta

DINYATAKAN LAIK ETIK

Surabaya, 10 Januari 2005



Soedibjo Hari Poernomo, dr., DTMH.
NIP. 480 359 279