

DISERTASI

UJI TRIPANOSIDAL DIMINAZEN ASETURAT

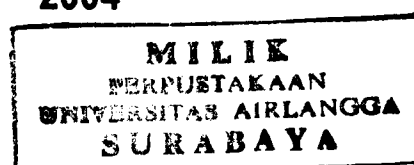
Perancangan regimen dosis efektif dan pemeriksaan toksisitas akibat pemberian obat berulang pada kambing Peranakan Etawa penderita tripanosomiasis



MOCHAMAD LAZUARDI

**PROGRAM PASCASARJANA
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA**

2004

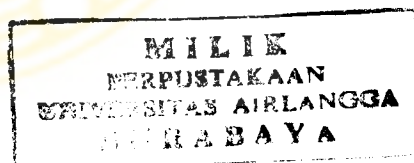


UJI TRIPANOSIDAL DIMINAZEN ASETURAT

**Perancangan regimen dosis efektif dan pemeriksaan toksisitas
akibat pemberian obat berulang pada
kambing Peranakan Etawa penderita tripanosomiasis**

DISERTASI

**Untuk memperoleh Gelar Doktor
dalam Program Studi Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Pada Program Pascasarjana Universitas Airlangga
Telah dipertahankan di hadapan
Panitia Ujian Doktor Terbuka
Pada hari : Selasa
Tanggal : 30 November 2004
Pukul 10.⁰⁰ WIB**



Oleh :

MOCHAMAD LAZUARDI
NIM. 099813156 D

Lembar Pengesahan :

**DISERTASI INI TELAH DISETUJUI
TANGGAL 30 Desember 2004**

Oleh

Promotor



Prof. Dr. A. Aziz Hubeis, Apt

Ko promotor



**Prof. Dr. Rochiman Sasmita , Drh., MS., MM
NIP. 130350739**

UCAPAN TERIMA KASIH

Dengan kerendahan hati saya panjatkan puji syukur kehadirat Allah SWT atas rahmat dan karunia yang telah diberikan sehingga saya mendapatkan kekuatan, ketabahan dan rasa syukur dalam menyelesaikan disertasi ini.

Semenjak saya menjalani masa pendidikan mulai Agustus 1998 hingga menyelesaikan pendidikan, sudah tak terhitung bantuan yang telah diberikan oleh sanak famili, guru, teman semata-mata untuk kelancaran studi. Bantuan diberikan dengan tulus yang tak mampu saya sampaikan bagaimana bentuk sepiantasnya untuk menyampaikan rasa terima kasih.

Terima kasih tak terhingga dan penghargaan yang setinggi-tingginya saya sampaikan kepada Prof. Dr. A. Aziz Hubeis, Apt sebagai promotor demikian pula Prof. Dr. Rochiman Sasmita, Drh., MS., MM, sebagai ko-promotor. Dengan rasa kebakapan Beliau banyak mengarahkan bagaimana hidup sebagai khalifah di bumi Allah SWT dan bagaimana berperilaku sebagai insan ilmiah.

Saya ucapkan terima kasih sebesarnya kepada Pemerintah Republik Indonesia melalui Menteri Pendidikan Nasional dilewatkan Tim Managemen Program Doktor atas bantuan finansial.

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

Rektor UNAIR Prof. Dr. Med. Puruhito, dr., dan mantan Rektor UNAIR Prof. Soedarto, dr., DTM & H, PhD., atas kesempatan dan fasilitas yang

diberikan kepada saya untuk mengikuti dan menyelesaikan pendidikan program Doktor.

Direktur Program Pascasarjana UNAIR Prof. Dr. Muhammad Amin, dr., SpP, dan mantan Direktur Program Pascasarjana UNAIR Prof. Dr. Soedijono Tirtowidarjo, dr., Sp. THT, atas kesempatan yang diberikan kepada saya untuk menjadi siswa Program Doktor pada Program Pascasarjana UNAIR Surabaya.

Ketua Program Studi (KPS) S-3 MIPA Pascasarjana UNAIR Prof. Dr. Suhariningsih, Ir., dan mantan KPS S-3 MIPA UNAIR Prof. Dr. Gde Nyoman Astika, Apt.

Dekan Fakultas Kedokteran Hewan UNAIR, Prof. Dr. Ismudiono, Drh., MS, yang telah memberi izin untuk mengikuti pendidikan program Strata 3 serta Prof. Dr. Soehartojo Hardjoprano, Drh. MSc., yang pertama kali merekomendasikan untuk mengikuti pendidikan Strata tiga di UNAIR.

Kepala Bagian Farmasi-Kedokteran FK UNAIR Nuraini Farida, Dra., MS., Apt, AFK dan mantan Kepala Lab. Farmasi-Kedokteran FK UNAIR, Muhammad Usman, dr. AFK, yang telah mengizinkan memanfaatkan fasilitas di bagian.

Kepala Pusat Veterina Farma (PUSVETMA), DITJENNAK, DEPTAN RI, Syamsul Bahri Siregar Drh., MSc saat tahun 2001 mengizinkan untuk menggunakan fasilitas di Lab PMPP.

Prof. Soegiono Ir., MSc, mantan Rektor Institut Teknologi Sepuluh November (ITS) Surabaya dan Dr. Sugeng Winardi Ir., M.Eng, mantan Ketua Jurusan Teknik Kimia (TekKim) ITS, serta Farid Efendi Ir., MEng

mantan kepala Lab. Team Afiliasi dan Konsultasi Industri TekKim ITS, yang mengizinkan untuk bekerja di TekKim ITS.

Prof. Dr. Yoes Prijatna Dahlan, dr., MSc., sebagai Ketua Pusat Penelitian Penyakit Tropis UNAIR yang mengizinkan saya bekerja di lingkungan TDC. Kepada Dr. Darminto, Drh., sebagai Kepala BALITVET di Bogor di bantu Sdr. Amir Husein, Drh, yang mempersilahkan kerja di Laboratorium setempat.

Para konsultan Dr. Reto Brun dari *Swiss Tropical Institut Protozoologi LabSocinstr, Basel Switzerland.*, Prof. Dr. Bruce Gummow dari seksi epidemiologi *Faculty of Veterinarian Science University of Pretoria South Africa*, Dr. Jan Du Preez dari Lembaga Riset *Potchefstroom University, South of Africa*, yang memberikan arahan selama penelitian berlangsung.

Kepada Yth ibu Yusi sebagai pimpinan PT Intervet Indonesia di Jakarta yang membantu kelancaran selama penelitian hingga prosesi ujian tahap II dilakukan, demikia pula kepada Dr. Teguh Prajitno, dan Dr. Sitipom Praneenij.

Tak lupa pula kepada Teguh Sumardiono, Drh mantan staf Dinas Peternakan Kodya Surabaya yang membantu pengadaan kambing PE dan Dr. Edi Bagus Wasito, dr., MS, di Lab. Diarhae TDC UNAIR, Irtizam Drh., Mkes serta Ibu Sri Soesilo Drh dan Ibu Indah di Lab. PMPP PUSVETMA Surabaya.

Para konsultan penelitian di UNAIR dan UGM yaitu (Alm) Prof. Soegeng Soekamto, dr. MSc. Ph.D. Sp.PA., Dr. Joko Wahyono, Apt., Iwan Wiliyanto, Drh. MSc. Ph.D, atas saran dan koreksi.

Seluruh staf di Lab. Dasar Bersama UNAIR terutama Dr. Mulya Hadi Santoso, Apt, Aniek Setyabudiatin Dra., Apt. MSi, dan Toetik Aryani Dra., Apt, MSi. Tak lupa kepada Bapak Widodo Jatim Pudjirahardjo, dr., MS., MPH., Dr.PH dan seluruh staf di Bag.Kimia Analisis F.F UNAIR. Tak lupa kepada Siti Machmudah ST, Widyastuti ST, M.T dari TekKim ITS. Khusus untuk Nurhamidah Dra., MSi di jurusan Matematika FMIPA UNAIR disampaikan terima kasih atas pengolahan data farmakokinetik.

Kakak sekaligus guru saya dan teman-teman di Bag. Farmasi-Kedokteran FK UNAIR yaitu Prof. Nanizar-Zaman Yoenoos, Pharm.D, Haryono, dr.AFK, Haryanto Husein, dr. MS.AFK., Ratna Sofaria Munir, dr. MS.AFK., M. Teguh wahyudi, dr., MS.AFK., Roostantia Indrawati dr. Mkes.AFK., Bambang Hermanto, dr. MS.AFK., Arifa M, dr. Mkes, A. Mugni Dra., Apt, Rahmi Sugihartuti, Drh. Mkes, Liliek Maslachah Drh, Mkes, M. Sukmanadi, Drh. Mkes, Yuni Priyandani Ssi., Apt.

Tak lupa semua fihak yang berperan serta dan tak mungkin disebutkan satu persatu.

Khusus disampaikan sembah sujud saya kepada Ibunda Ny. Sri Watoen Hartoyo dan terima kasih diucapkan kepada kakak saya Kel. Budiharto dr., Sp.B, Kel. Ir. Indrajaya dan Kel (Alm) adik Budisakti juga Kel. kakak dan adik ipar.

Anak-anaku (Hendra, Handi, Aditya, Ichsananda) dan Istriku tercinta (Neny) maafkan Bapak yang selama ini kurang membagi perhatian. Akhir kata disampaikan, semoga Allah SWT membalas segala budi baik semua fihak dan mohon maaf bila saya berperilaku kurang berkenan.

Hasil pengerjaan Tahap I menunjukkan tripanosidal *in vitro* didapatkan pada 8,48 $\mu\text{g/ml}$ dan parasitemia ditemui pada dosis penularan $\geq 23,85 \cdot 10^6$ Trip/ml. KCKT dilakukan dengan cara isokratis (λ 370 nm), menghasilkan harga perolehan kembali 85,874–88,178 % (KV 3,08–4,85 %) dan batas deteksi - kuantifikasi 0,008 $\mu\text{g/ml}$ dan 0,024 $\mu\text{g/ml}$. Kadar puncak dosis tunggal subyek tertular dan sehat diperoleh $21,4 \pm 10,3$ $\mu\text{g/ml}$ dan $40,8 \pm 24,9$ $\mu\text{g/ml}$, $T_{1/2\beta}$ rerata $83,5 \pm 26,97$ jam⁻¹. Studi farmakogenetik $T_{1/2\beta}$ menunjukkan pola bimodal baik subyek tertular maupun sehat. Hasil studi hubungan dosis-respon diperoleh dosis 5 mg/kg berat badan telah menghasilkan daya tripanosidal.

Rancangan regimen dosis yang ditemukan adalah pemberian diawali dosis muatan 10,44 mg/kg berat badan dilanjutkan dosis pemeliharaan 7 mg/kg berat badan setiap 31 menit sebanyak empat kali.

Hasil evaluasi menunjukkan regimen dosis bersifat tripanosidal serta tak menghasilkan dampak toksik ($p < 0,05$). Perancangan regimen dosis menghasilkan kadar penjagaan batas kadar terapi lebih dari 24 jam.

Kesimpulan dalam penelitian menunjukkan regimen dosis diminazen aseturat pemberian berulang dapat mengeliminasi parasit *T. evansi* isolat Bangkalan dan aman digunakan. Hasil rancangan tersebut mampu menghasilkan perolehan waktu kadar penjagaan lebih dari 1 hari. Sebagai saran dalam penelitian adalah regimen dosis pemberian berulang dapat digunakan sebagai model aplikasi klinik lapangan bila kelak ditemukan kasus tripanosomiasis pada ternak ruminansia.

SUMMARY

THE TRYPNOCIDE ASSAY OF DIMINAZENE ACETURATE

The effective regimented dose design and toxicity investigated of consequence drug multiple administration on trypanosomiasis Etawa breed goats

Mochamad Lazuardi

Cases of trypanosomiasis in Indonesia animal husbandries has been a problem for the Indonesian livestock society since 1897. An eradication effort using chemotherapeutics (namely suramin) has been used as a barrier against the trypanocide agent. Diminazene aceturate is also used as an alternative drug, and in the future antitrypanosomes may be used. The problem remains how to find a regimented dose for the various isolated cases within Indonesia. Much research has to be done to find a dose that is powerfull enough to be effective yet safe for use in animals.

The research to find this, ideal, dose will consist of three stages : (a) A pre clinical stage, (b) dose design stage and (c) clinical trials. It is intended to use the Etawa breed of goats for this research and Trypanosoma evansi Bangkalan Isolates as the parasitic agent. Stage one, pre clinic will be sub-divided into five stages they are : (a.1) In vitro trypanocyde assay, (a.2) antigenic assay, (a.3) optimization-validation high performance liquid chromatography (HPLC), (a.4) a kinetic study of the diminazene aceturat, (a.5) dose vs. respon on trypanocide. The regimented dose design stage will work by (b) superimposing concept with multiple drug administrated. The clinical trials stage will be evaluated by (c.1) trypanocide assay, and (c.2) toxicity assay. The length of time the drug concentration exceeds the therapeutic concentration level (c.3)

measured in clinical trials stage. In the research stage, the trypanocycle in vitro concentration of diminazene aceturate obtained $8.48 \mu\text{g/ml}$ and the cumulative parasitic infection dose obtained 23.10^5 Trip/ml . The HPLC analysis using the isocratic method (λ 370 nm) determined the recovery at 83.874 – 88.178 % (KV 3.08-4.85 %). The limit of detection and limit of quantification were $8.10^{-3} \mu\text{g/ml}$ and $24.10^{-3} \mu\text{g/ml}$. The maximum concentration in infected and healthy goats was $21.4 \pm 10.3 \mu\text{g/ml}$ and $40.8 \pm 24.9 \mu\text{g/ml}$ respectively. The average parameter of $T\frac{1}{2}\beta$ was obtained thus $83.5 \pm 26.97 \text{ Jam}^{-1}$. The pharmacogenetic profile of $T\frac{1}{2}\beta$ on infected and healthy goats was bimodal models. The two modes being at $82,67 \text{ jam}^{-1}$ and 131 jam^{-1} . The result study of dose respon suggested that 5 mg/kg bw would have an adequate effect against trypanocycle. This regimented dose design concluded that for effect an initial dose of 10.44 mg/kg bw, be follow by, four additional doses at a concentration of 7 mg/kg bw, administered every 31 minutes. The result clinical trials showed a marked effect against trypanocycle with no toxic side effect when applied ($p < 0.05$). The dose used was effective in all trypanocycle test. The length of time the drug concentration exceeds the therapeutic concentration level obtained at $\geq 24 \text{ hours}$ ($p > 0.05$).

The results of the trials proved that using the doses mentioned in the previous paragraphs trypanocycle was eradicated in all the clinical subject. Research recommendations were that the new regimen may be used as an alternative to present methods when treating trypanosome.

ABSTRACT**THE TRYPANOCIDE ASSAY OF DIMINAZENE ACETURATE**

The effective regimented dose design and toxicity investigated of consequence multiple drug administration on trypanosomiasis Etawa breed goats

Cases of trypanosomiasis in Indonesian animal husbandries has been a problem for the Indonesian livestock society since 1897. The major problem in controlling trypanosomiasis was in the use of available medicines. This problem was exacerbated by the fact that suramin the main medicine used was not produced again except for research purposes. The Indonesian Government recommended other trypanocide agents (isometamidium chloride and diminazene acetate) which were readily available within Indonesia for the treatment of trypanosomiasis. However research had shown that isometamidium chloride was particularly ineffective unless used in exceptionally high doses. Because of these ongoing problems it was decided that more research was needed both into the disease and the dose level (of diminazene acetate) to obtain a new dosage regimen with trypanocide activities and prevent toxic side effects.

The experimental research used three design they were : pre, true and quasi experimental. The parasites used in the research were of the *Trypanosoma evansi* Bangkalan Isolates. The subjects of the research were Etawa breed goats sourced from the Surabaya area. To determine the concentration of diminazene acetate, goat plasma was screened using reverse-phase high performance liquid chromatography, with ion pairing. To examine the parasites within the blood samples were examined using biological assay and card agglutination base on common surface antigen. To discover the toxic effect of medicines used in the research, a screen of ante mortem toxic symptoms was used continuously with liver and renal histopathology techniques.

The research indicated that the new dosage regimen should be used as follows ; (a) loading dose 10.44 mg/kg body weight, (b) maintenance dose 7 mg/kg body weight. (c) After the initial dose of 10,44 mg/kg bw fourth additional maintenance dose should be administered at 31 minute intervals. This formula will work effectively against *Trypanosoma evansi* Bangkalan Isolates and safety for using ($P < 0.05$). The length of time the drug concentration exceeds the therapeutic concentration level obtained at ≥ 24 hours ($p > 0.05$).

The results of the test confirm that the new dosage regimen may be used as an alternative model when giving diminazene acetate as a remedy against ruminant trypanosomiasis.

Key Words : *Trypanosoma evansi*, Diminazene acetate
Superimpose, Dosage Regimen, Toxicity

DAFTAR ISI

	Halaman
Sampul Depan	i
Sampul Dalam	ii
Prasyarat Gelar	iii
Lembar Pengesahan.....	iv
Penetapan Panitia	v
UCAPAN TERIMA KASIH	vi
RINGKASAN	x
<i>SUMMARY</i>	xii
<i>ABSTRACT</i>	xiv
DAFTAR ISI	xv
DAFTAR TABEL	xviii
DAFTAR GAMBAR.....	xx
DAFTAR LAMPIRAN	xxiii
DAFTAR SINGKATAN PENTING	xxvi
DAFTAR ARTI HURUF DAN ARTI LAMBANG PENTING	xxviii
BAB 1 PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	6
1.3 Tujuan Penelitian	6
1.3.1 Tujuan umum	6
1.3.2 Tujuan khusus	6
1.4 Manfaat Penelitian	7
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA	8
2.1 Diminazen aseturat	8
2.1.1 Sifat fisikokimia	9
2.1.2 Penggunaan klinik	10
2.1.3 Mekanisme aksi.....	11
2.1.4 Farmakokinetik	13
2.1.5 Farmakogenetik	25
2.1.6 Kontraindikasi dan reaksi lanjutan	27
2.1.7 Penentuan kadar	28
2.2 Tripanosomiasis Pada Hewan	30
2.2.1 Biokimia	31
2.2.2 <i>Antigenic variation surface (AVS)</i>	35
2.2.3 Patogenesis	38
2.2.4 Kultivikasi <i>in vitro</i>	41
2.2.5 Diagnostik	44
2.3 Regimen Dosis Pemberian Berulang	48
2.3.1 Superposisi	49
2.3.2 Macam strategi pemberian dosis berulang	50
2.4 Disposisi dan Toksisitas Diminazen Aseturat Pada Organ dan Jaringan	55
2.4.1 Disposisi diminazen aseturat pada organ dan jaringan	55
2.4.2 Toksisitas diminazen aseturat pada organ dan jaringan	57

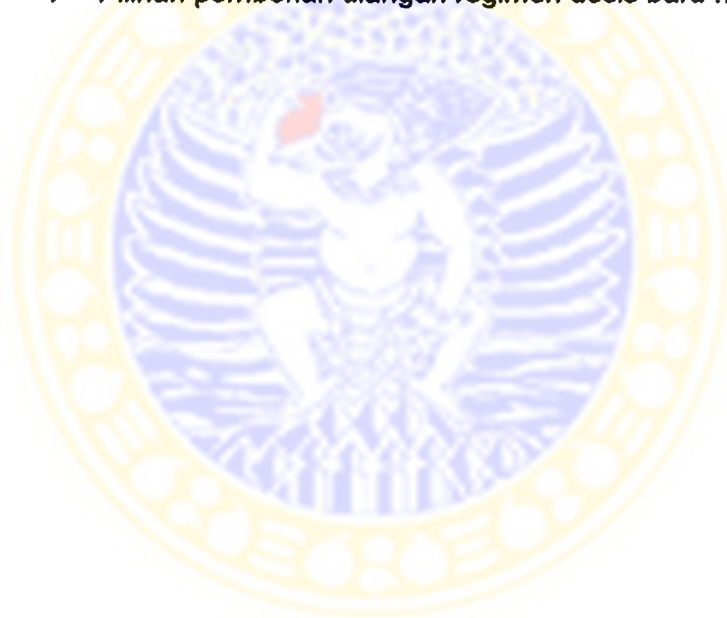
2.5	Hewan Coba Dalam Studi Antitripanosomiasis	59
2.5.1	Praperlakuan pada studi antitripanosomiasis	59
2.5.2	Pengamanan selama penularan <i>Tripanosoma</i> dilakukan	61
BAB 3	KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN	62
3.1	Kerangka Konseptual	62
3.2	Hipotesis Penelitian	64
BAB 4	MATERI DAN METODE PENELITIAN	66
4.1	Rancangan Penelitian	66
4.2	Populasi dan Sampel	68
4.3	Identifikasi Variabel	73
4.3.1	Variabel bebas	73
4.3.2	Variabel tergantung	73
4.3.3	<i>Confounding variable</i>	73
4.3.4	<i>Intervening variable</i>	73
4.3.5	Variabel kendali	74
4.4	Definisi Operasional Variabel	74
4.4.1	Sehat	74
4.4.2	Seri pengenceran obat metode uji tripanosidal <i>in vitro</i>	74
4.4.3	Klasifikasi parasitemia	75
4.4.4	Antigenitas parasit terhadap temak	75
4.4.5	Pengamatan uji tripanosidal secara <i>in vitro</i>	75
4.4.6	Dosis dan rute pemberian, pengambilan cuplikan, interval waktu pengambilan cuplikan keperluan studi kinetik dosis tunggal	76
4.4.7	Parameter perwatakan kinetik dosis tunggal	77
4.4.8	Pengamatan parameter kinetik pada studi farmakogenetik	77
4.4.9	Dosis dan rute pemberian parasit maupun diminazen aseturat pada studi hubungan dosis terhadap respon tripanosidal	77
4.4.10	Kriteria respon tripanosidal dosis tunggal	78
4.4.11	Perancangan regimen dosis pemberian berulang	78
4.4.12	Uji biologis	80
4.4.13	Pengambilan cuplikan darah pemberian dosis berulang	80
4.4.14	Analisis perolehan kadar pemberian berulang	81
4.4.15	Toksistas diminazen aseturat	81
4.4.16	Interpretasi pembacaan pada pemeriksaan CATT	84
4.5	Bahan Penelitian	84
4.5.1	Hewan coba	84
4.5.2	Asal hewan coba	85
4.5.3	Seleksi hewan coba	85
4.5.4	Parasit darah	86
4.5.5	Baku diminazen aseturat, suramin dan obat	86
4.5.6	Bahan kimia	87
4.5.7	Peralatan	87
4.6	Lokasi dan Waktu Penelitian	88
4.7	Prosedur Penelitian	89
4.7.1	Studi <i>in vitro</i> tripanosidal diminazen aseturat	89
4.7.2	Studi antigenitas parasit pada kambing PE	95
4.7.3	Optimasi dan validasi Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT)	96
4.7.4	Studi kinetik dosis tunggal (termasuk studi farmakogenetik)	103
4.7.5	Studi hubungan dosis terhadap respon tripanosidal	104
4.7.6	Perancangan regimen dosis pemberian berulang	105

4.7.7	Uji tripanosidal, pengamatan toksisitas <i>ante mortem</i> , uji perolehan waktu kadar penjagaan dan uji biologis	107
4.7.8	Studi toksisitas <i>post mortem</i>	110
4.7.9	Pengerjaan CATT	111
4.8	Analisis data	112
BAB 5	ANALISIS HASIL PENELITIAN	115
5.1	Preklinik (Tahap I)	115
5.1.1	Studi <i>in vitro</i> diminazen aseturat	115
5.1.2	Uji antigenitas	119
5.1.3	Optimasi dan validasi KCKT	123
5.1.4	Perwatakan kinetik dosis tunggal	129
5.1.5	Studi hubungan dosis terhadap respon tripanosidal Kambing... ..	136
5.2	Perancangan Regimen Dosis Berulang (Tahap II)	138
5.2.1	Penentuan dosis terapi	138
5.2.2	Penentuan batas kadar terapi	139
5.2.3	Penentuan dosis muatan	140
5.2.4	Penentuan dosis penjagaan	140
5.2.5	Penentuan interval waktu pemberian	140
5.2.6	Penentuan jumlah pemberian ulangan	140
5.3	Uji Klinik	141
5.3.1	Uji tripanosidal	141
5.3.2	Uji biologis	149
5.3.3	Uji toksisitas	150
5.3.4	Studi perolehan waktu penjagaan kadar	160
5.3.5	Pemeriksaan seroparasitologi (CATT)	167
BAB 6	PEMBAHASAN	168
6.1	Preklinik (Tahap I)	168
6.1.1	Studi <i>in vitro</i> diminazen aseturat	168
6.1.2	Uji antigenitas	173
6.1.3	Optimasi dan validasi KCKT	176
6.1.4	Perwatakan kinetik dosis tunggal	177
6.1.5	Studi hubungan dosis terhadap respon tripanosidal	185
6.2	Perancangan Regimen Dosis Berulang (Tahap II)	188
6.2.1	Penentuan dosis terapi	188
6.2.2	Penentuan batas kadar terapi	191
6.2.3	Penentuan dosis muatan	194
6.2.4	Penentuan dosis penjagaan	195
6.2.5	Penentuan interval waktu pemberian	197
6.2.6	Penentuan jumlah pemberian ulangan	198
6.3	Uji Klinik	200
6.3.1	Uji tripanosidal	200
6.3.2	Uji biologis	203
6.3.3	Uji toksisitas	206
6.3.4	Pemeriksaan organ hati dan ginjal	209
6.3.5	Studi perolehan waktu penjagaan kadar terapi	217
6.3.6	Pemeriksaan seroparasitologi	221
BAB 7	KESIMPULAN DAN SARAN	223
7.1	Kesimpulan	223
7.2	Saran	223
DAFTAR PUSTAKA	224

DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 2.1 : Data kinetik diminazen aseturat domba Rams	22
Tabel 2.2 : Parameter kinetik diminazen aseturat pada domba sehat	23
Tabel 2.3 : Parameter kinetik diminazen aseturat pada plasma dan cairan serebrospinal kambing sehat	24
Tabel 2.4 : Analisis diminazen aseturat dalam matrik biologi.....	28
Tabel 2.5 : Enzim keperluan metabolisme <i>Tripanosoma</i>	34
Tabel 2.6 : Media pertumbuhan <i>in vitro</i> untuk <i>Tripanosoma</i> spesies	42
Tabel 2.7 ^a : Teknik diagnostik menemukan parasit <i>Tripanosoma</i>	44
Tabel 2.7 ^b : Teknik diagnostik seroparasitologi	46
Tabel 2.8 : Jumlah makromolekul bertugas menyebarkan obat	49
Tabel 2.9 : Macam pemberian obat berulang	50
Tabel 2.10 : Pemberian dosis berulang diminazen aseturat pada domba bunting penderita <i>Tripanosomiasis</i>	54
Tabel 4.1 : Macam Rancangan Penelitian	66
Tabel 4.2 : Penentuan jumlah sampel	71
Tabel 4.3 : Kriteria tripanosidal kemoterapi antitripanosoma	78
Tabel 4.4 : Kriteria gejala klinik akibat toksisitas	82
Tabel 4.5 : Kriteria tingkat aglutinasi	84
Tabel 4.6 : Seleksi hewan coba	85
Tabel 4.7 : Kriteria sehat hewan coba pra perlakuan	86
Tabel 4.8 : Lokasi dan Waktu Penelitian	89
Tabel 4.9 : Pemilahan kambing perlakuan pada uji klinik	107
Tabel 5.1 : Jumlah parasit/ml hasil pemanenan tikus tertular.....	115
Tabel 5.2 : Rentang kadar tripanosidal diminazen aseturat	116
Tabel 5.3 : Kadar tripanosidal diminazen aseturat	117
Tabel 5.4 : Stok dosis penularan dan perkembangan parasitemia	120
Tabel 5.5 : Dosis kumulatif <i>Tripanosoma</i> penimbul parasitemia kambing perlakuan	121
Tabel 5.6 : Hubungan kadar analit dalam air dan area kromatogram	125
Tabel 5.7 : Harga <i>recovery</i> dan koefisien variasi serial kadar diminazen aseturat dalam plasma	127
Tabel 5.8 : Hubungan rerata kadar diminazen aseturat dalam plasma dengan rerata area kromatogram	128
Tabel 5.9 : Harga SGPT, SGOT, KREATININ, BUN, Hb praperlakuan studi kinetik diminazen aseturat dosis tunggal	130
Tabel 5.10 : Parameter kinetik diminazen aseturat dosis tunggal pada kambing tertular	132
Tabel 5.11 : Parameter kinetik diminazen aseturat dosis tunggal pada kambing sehat	133
Tabel 5.12 : Uji perbedaan parameter kinetik diminazen aseturat dosis tunggal antar kelompok	135
Tabel 5.13 : Harga SGPT, SGOT, KREATININ, BUN, Hb praperlakuan studi hubungan dosis terhadap respon tripanosidal	136
Tabel 5.14 : Studi hubungan dosis dan respon tripanosidal pada kambing jantan Peranakan Etawa (PE)	137
Tabel 5.15 : Analisis probit dosis terhadap respon tripanosidal	139
Tabel 5.16 : Regimen dosis pemberian berulang	141
Tabel 5.17 : Hasil pengerjaan tripanosidal kelompok perlakuan	143

Tabel 5.18	:	Hasil pengerjaan tripanosidal kelompok kontrol	144
Tabel 5.19	:	Hasil uji tripanosidal pasca pengobatan antara perlakuan dan kontrol	145
Tabel 5.20	:	Uji biologis darah kambing tertular	149
Tabel 5.21	:	Gejala klinik toksik pemberian diminazen aseturat	151
Tabel 5.22	:	Pemeriksaan makroskopis hati dan ginjal	152
Tabel 5.23	:	Pengamatan histopatologi organ hati dan ginjal	155
Tabel 5.24	:	Uji hipotesis keamanan penggunaan diminazen aseturat melalui pemeriksaan histopatologi organ hati, ginjal	156
Tabel 5.25	:	Pemeriksaan kimia klinik praperlakuan subyek pemberian berulang	160
Tabel 5.26	:	Uji hipotesis perolehan waktu penjagaan kadar \geq batas kadar terapi	161
Tabel 5.27	:	Perolehan kadar pemberian berulang kelompok perlakuan ..	162
Tabel 5.28	:	Perolehan kadar pemberian berulang kelompok kontrol	164
Tabel 5.29	:	Hasil uji card <i>agglutination</i>	167
Tabel 6.1	:	Dosis tunggal tripanosidal diminazen aseturat	191
Tabel 6.2	:	Aneka dosis ulangan diminazen aseturat dalam klinik	196
Tabel 6.3	:	Harga letal dosis median secara <i>in vitro</i>	220
Tabel 6.4	:	Pilihan pemberian ulangan regimen dosis baru	221



DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 2.1 : Struktur molekul diminazen aseturat	9
Gambar 2.2 : Mekanisme aksi diminazen aseturat pada k-DNA mitokondria kerabat tripanosoma	13
Gambar 2.3a : Kinetika obat dua kompartemen terbuka ekstrasvaskular	14
Gambar 2.3b : Profil farmakokinetik kadar obat dalam darah ($\mu\text{g/ml}$) vs. waktu (menit) dua kompartemen terbuka ekstrasvaskular	17
Gambar 2.4 : Reaksi lanjutan diminazen aseturat dengan kontraindikasi hewan peka bunting	27
Gambar 2.5 : Glikolisis pada <i>Trypanosoma</i> dewasa, kotak metabolit glikosom dan sitosol adalah nutrisi atau produk akhir metabolisme.....	33
Gambar 2.6 : Sketsa tempat variant antigenik permukaan	37
Gambar 2.7a : Pemberian dosis berulang ^{1,2,3,4,5} penderita insufisiensi ginjal	51
Gambar 2.7b : Pemberian diawali dosis awal ⁽¹⁾ selanjutnya dilakukan pengulangan interval waktu tertentu dengan dosis pemeliharaan ^{(2) (3)}	51
Gambar 2.7c : Pemberian dosis berulang diawali dosis lazim ⁽¹⁾ selanjutnya dilakukan peningkatan dosis ^(2,3,4) serta interval pemberian .	52
Gambar 2.7d : Pemberian dosis berulang diawali dosis muatan ⁽¹⁾ disusul dosis pemeliharaan pada interval waktu sama ^(2,3,4)	53
Gambar 2.7e : Pemberian dosis berulang ^(1,2,3,4,5,6) dengan interval dan dosis yang sama akan menghasilkan kadar tunak	55
Gambar 2.8 : Pengaruh diminazen aseturat pada lemak hati dan kematian sel	57
Gambar 3.1 : Kerangka konseptual penelitian perancangan regimen dosis diminazen aseturat terhadap <i>Trypanosoma evansi</i> isolat Bangkalan	65
Gambar 4.1 : Rangkaian kerangka operasional selama penelitian dilakukan	67
Gambar 4.2 : Tempat sumuran mikroplat kelompok perlakuan dan kontrol	75
Gambar 4.3 : Arah pengamatan pada sumuran mikroplat	76
Gambar 4.4 : Daerah limbus dan tempat pengukuran bagian hati pada skema bentuk medial organ hati kambing	82
Gambar 4.5 : Daerah pengukuran ginjal pada gambar skematik ginjal kambing	83
Gambar 4.6 : Interpretasi pembacaan pada pemeriksaan CATT	84
Gambar 4.7 : Teknik preparasi <i>Trypanosoma</i> dari sel darah	93
Gambar 5.1a : Pemberian kadar 8,48 $\mu\text{g/ml}$ diminazen aseturat pada <i>T. evansi</i> isolat Bangkalan (400x)	118
Gambar 5.1b : Pemberian kadar 6,6 $\mu\text{g/ml}$ suramin pada <i>T. evansi</i> isolat Bangkalan (400x)	118
Gambar 5.1c : Kontrol (-) dengan adanya <i>T. evansi</i> isolat Bangkalan pada sumur mikroplat (natif, 400x)	118
Gambar 5.2a : Hubungan waktu timbulnya parasit dengan jumlah dosis penularan pada kambing perlakuan (Kambing perlakuan-1).	122

Gambar 5.2b	: Hubungan waktu timbulnya parasit dengan jumlah dosis penularan pada kambing perlakuan (Kambing perlakuan-2).	122
Gambar 5.2c	: Hubungan waktu timbulnya parasit dengan jumlah dosis penularan pada kambing perlakuan (Kambing perlakuan-3).	123
Gambar 5.3	: Kromatogram diminazen aseturat (2,6 µg/ml dalam air) dengan waktuambat 10,379 menit, pada eluen fase mobil (pH 5,5) asetonitril : air (30 : 70) mengandung 0,005 M 1-octano sulphonic acid sod. salt, 0,1 % Trietilamin	124
Gambar 5.4	: Kromatogram (a) plasma blanko dan (b) diminazen aseturat 1 µg/ml dalam plasma (waktuambat 10,455 menit) pada λ 370 nm dengan eluen fase mobil asetonitril : air (30 : 70) 0,005 M 1-octanosulphonic acid sod salt., 0,1 % Trietilamin, pH 5,5	126
Gambar 5.5	: Linieritas kadar dan rerata area analit dalam plasma	128
Gambar 5.6	: Profil farmakokinetik diminazen aseturat pemberian 7 mg/kg berat badan intramuskular pada kambing jantan Peranakan Etawa (PE) penderita Tripanosomiasis	134
Gambar 5.7	: Profil farmakokinetik diminazen aseturat pemberian 7 mg/kg berat badan intramuskular pada kambing jantan Peranakan Etawa (PE)	134
Gambar 5.8	: Waktu paruh eliminasi diminazen aseturat pada 10 ekor Kambing PE pemberian 7 mg/kg berat badan intramuskular	135
Gambar 5.9	: Hubungan antara dosis diminazen aseturat dengan respon tripanosidal pada kambing PE penderita <i>T. evansi</i> isolat Bangkalan	139
Gambar 5.10	: Daya tripanosidal diminazen aseturat pemberian berulang pada kambing penderita <i>T. evansi</i> isolat Bangkalan pengobatan hari ke 8	145
Gambar 5.11	: Hasil ulas darah uji tripanosidal subyek perlakuan dan kontrol pewarnaan Giemsa	147
Gambar 5.11a	: 7 hari masa penularan subyek perlakuan (pewarnaan Giemsa, 400x)	147
Gambar 5.11b	: 5 jam pasca pengobatan subyek perlakuan (pewarnaan Giemsa, 400x)	147
Gambar 5.11c	: 24 jam pasca pengobatan subyek perlakuan (pewarnaan Giemsa, 400x)	147
Gambar 5.11d	: 7 hari masa penularan subyek kontrol (pewarnaan Giemsa, 400x)	147
Gambar 5.11e	: 27 hari masa uji tripanosidal subyek kontrol (pewarnaan Giemsa, 400x)	147
Gambar 5.12	: Hasil ulas darah uji tripanosidal subyek perlakuan dan kontrol (pewarnaan <i>Acridine Orange</i>)	148
Gambar 5.12a	: 7 hari masa penularan subyek perlakuan (pewarnaan <i>Acridine Orange</i> , 400x)	148
Gambar 5.12b	: 5 jam pasca pengobatan subyek perlakuan (pewarnaan <i>Acridine Orange</i> , 400x)	148
Gambar 5.12c	: 7 hari masa penularan subyek kontrol (pewarnaan <i>Acridine Orange</i> , 400x)	148
Gambar 5.12d	: 27 hari masa uji tripanosidal subyek kontrol (pewarnaan <i>Acridine Orange</i> , 400x)	148
Gambar 5.13	: Seri gambar histopatologi organ hati	157

Gambar 5.13a	: Susunan sel hati subyek perlakuan dalam segi tiga Kiernan dan vena sentralis (100x)	157
Gambar 5.13b	: Susunan radier sel hati subyek perlakuan (200x)	157
Gambar 5.13c	: Sel hati subyek perlakuan (400x).....	157
Gambar 5.14	: Seri gambar histopatologi organ ginjal	158
Gambar 5.14a	: Tubulus contortus glomerulus ginjal subyek perlakuan (200x)	158
Gambar 5.14b	: Sel epitel lumen tubulus contortus glomerulus ginjal subyek perlakuan tak terjadi pembengkakan. Lumen tubulus tak terjadi penyempitan. Kapsula Bowman tak terdapat daerah melebar (400x).....	158
Gambar 5.14c	: Ruang antara Kapsula Bowman glomerulus ginjal subyek perlakuan (200x)	158
Gambar 5.15	: Gambaran histopatologi organ ginjal dan hati subyek kontrol sakit dan kontrol sehat	159
Gambar 5.16	: Degenerasi melemak sel hati kontrol sakit (400x)	159
Gambar 5.15a	: Pengkerutan glomerulus ginjal kontrol sakit (400x)	159
Gambar 5.15b	: Sel hati kontrol sehat (400x)	159
Gambar 5.16a	: Batas Kapsula Bowman ginjal kontrol sehat (400x)	159
Gambar 5.16b	: Kadar penjagaan diminazen aseturat pemberian berulang pada kelompok kambing penderita tripanosomiasis.....	166
Gambar 5.17	: Kadar penjagaan diminazen aseturat pemberian berulang pada kelompok kambing kontrol.....	166
Gambar 5.18	: Uji <i>Card aglutination</i> serum darah kambing penderita <i>T. evansi</i> isolat Bangkalan pasca pengobatan diminazen aseturat pemberian berulang	167
Gambar 5.19	: Kultur <i>in vitro</i> terkontaminasi jamur (400x)	168
Gambar 6.1	: Grafik kontrol harga waktu paruh seluruh individu kambing studi perwatakan kinetik diminazen aseturat dosis tunggal	183
Gambar 6.2	: Hubungan antara perkembangan parasitemia dengan kenaikan suhu rektal setiap hari terhadap seluruh kambing perlakuan sebelum dilakukan pengobatan	187
Gambar 6.3	: Kemampuan tripanosidal diminazen aseturat dosis 3,5 mg, 5 mg, 7 mg/ kg berat badan terhadap <i>T. evansi</i> isolat Bangkalan	188
Gambar 6.4	: Struktur sel hati ^(A) dan sel epitel tubulus proksimalis ginjal ^(B) kambing pasca pengobatan pemberian berulang diminazen aseturat (1000x)	216

DAFTAR LAMPIRAN

		Halaman
Lampiran 1.1	: KETERANGAN HEWAN COBA KAMBING	241
Lampiran 1.2	: KETERANGAN HEWAN COBA TIKUS DAN MENCIT	242
Lampiran 2	: ISOLAT PARASIT	243
Lampiran 3.1	: <i>CERTIFICATE of ANALYSIS DIMINAZENE ACETURAT</i>	244
Lampiran 3.2	: <i>CERTIFICATE OF ANALYSIS BERENIL GRANULS</i>	245
Lampiran 4	: MEDIA TIOGLIKOLAT– PEWARNAAN ACRIDINE ORANGE	246
Lampiran 5	: PANJANG GELOMBANG DIMINAZEN ASETURAT DALAM AIR.....	247
Lampiran 6.1	: <i>FORM CHECK LIST</i>	248
Lampiran 6.2	: PERHITUNGAN JUMLAH PARASIT YANG DIGUNAKAN ...	248
Lampiran 7.1	: UJI HIPOTESIS ANTARA PERLAKUAN DIM. ASET. VS SURAMIN	249
Lampiran 7.2	: UJI HIPOTESIS ANTARA PERLAKUAN DIM. ASET VS. KONTROL	249
Lampiran 8	: UJI HIPOTESIS ANTIGENITAS PERLAKUAN VS. KONTROL	250
Lampiran 9	: PARAMETER KINETIK DOSIS TUNGGAL KAMBING SE- HAT K-1.....	251
Lampiran 10	: PARAMETER KINETIK DOSIS TUNGGAL KAMBING SE- HAT K-2	252
Lampiran 11	: PARAMETER KINETIK DOSIS TUNGGAL KAMBING SE HAT K-3	253
Lampiran 12	: PARAMETER KINETIK DOSIS TUNGGAL KAMBING SE- HAT K-4	254
Lampiran 13	: PARAMETER KINETIK DOSIS TUNGGAL KAMBING SE- HAT K-5	255
Lampiran 14	: PARAMETER KINETIK DOSIS TUNGGAL KAMBING TER- TULAR K-6	256
Lampiran 15	: PARAMETER KINETIK DOSIS TUNGGAL KAMBING TER- TULAR K-7	257
Lampiran 16	: PARAMETER KINETIK DOSIS TUNGGAL KAMBING TER- TULAR K-8	258
Lampiran 17	: PARAMETER KINETIK DOSIS TUNGGAL KAMBING TER- TULAR K-9	259
Lampiran 18	: PARAMETER KINETIK DOSIS TUNGGAL KAMBING TER- TULAR K-10	260
Lampiran 19	: KADAR ESTIMASI SATU KALI PEMBERIAN SUBYEK K-6 HINGGA K-10	261

Lampiran 20	: KADAR ESTIMASI SATU KALI PEMBERIAN SUBYEK K-1 HINGGA K-5	262
Lampiran 21.1	: UJI PERBEDAAN PARAMETER K_a ANTAR KELOMPOK ...	263
Lampiran 21.2	: UJI PERBEDAAN PARAMETER ALFA ANTAR KELOMPOK.....	263
Lampiran 21.3	: UJI PERBEDAAN TMAKS ANTAR KELOMPOK	264
Lampiran 21.4	: UJI PERBEDAAN PARAMETER CMAKS ANTAR KELOMPOK	264
Lampiran 21.5	: UJI PERBEDAAN PARAMETER VOLUME DISTRIBUSI ANTAR KELOMPOK	265
Lampiran 21.6	: UJI PERBEDAAN PARAMETER WAKTU PARUH ELIMINASI ANTAR KELOMPOK	265
Lampiran 21.7	: UJI PERBEDAAN PARAMETER KLIRENS ANTAR KELOMPOK	266
Lampiran 21.8	: UJI PERBEDAAN AUC ANTAR KELOMPOK	266
Lampiran 22	: PENENTUAN MODA BERDASARKAN WAKTU PARUH ELIMINASI SELURUH SUBYEK PADA STUDI KINETIK SATU KALI PEMBERIAN	267
Lampiran 23	: DAFTAR NILAI PROBIT BERHUBUNGAN DENGAN RESPON TRIPANOSIDAL	267
Lampiran 24	: PENENTUAN BATAS KADAR TERAPI MINIMUM DAN INTERVAL PEMBERIAN ULANG	268
Lampiran 25	: PERKIRAAN KADAR PEMBERIAN BERULANG MENGGUNA-KAN METODE SUPERPOSISI	269
Lampiran 26	: KADAR ESTIMASI "SUPERIMPOSE" DOSIS 10,44 dan 7 mg/kg bb SATU KALI PEMBERIAN	269
Lampiran 27	: UJI HIPOTESIS KEMAMPUAN TRIPANOSIDAL	270
Lampiran 28	: UJI HIPOTESIS KEL. MENCIT PERLAKUAN VS. KONTROL	270
Lampiran 29	: UJI HIPOTESIS PERBEDAAN TIDAK DITEMUINYA GEJALA TOKSIK	271
Lampiran 30.1	: UJI HIPOTESIS PEMBESARAN UKURAN ORGAN HATI-1 DAN GINJAL-1 ANTAR PERLAKUAN	271
Lampiran 30.2	: UJI HIPOTESIS PEMBESARAN UKURAN ORGAN HATI-2 DAN GINJAL-2 ANTAR PERLAKUAN	272
Lampiran 30.3	: UJI HIPOTESIS PEMBESARAN UKURAN ORGAN HATI-3 DAN GINJAL-3 ANTAR PERLAKUAN	272
Lampiran 30.4	: UJI HIPOTESIS PEMBESARAN UKURAN ORGAN HATI-4 DAN GINJAL-4 ANTAR PERLAKUAN	273
Lampiran 30.5	: UJI HIPOTESIS PEMBESARAN UKURAN ORGAN HATI-5 DAN GINJAL-5 ANTAR PERLAKUAN.....	273
Lampiran 31	: UJI HIPOTESIS PADA PEMERIKSAAN HISTOPATOLOGI.	274
Lampiran 32	: PEMBERIAN BERULANG DIMINAZEN ASETURAT KAMBING SAKIT-1.....	275

Lampiran 33	: PEMBERIAN BERULANG DIMINAZEN ASETURAT KAMBING SAKIT-2.....	276
Lampiran 34	: PEMBERIAN BERULANG DIMINAZEN ASETURAT KAMBING SAKIT-3.....	277
Lampiran 35	: PEMBERIAN BERULANG DIMINAZEN ASETURAT KAMBING SAKIT-4.....	278
Lampiran 36	: PEMBERIAN BERULANG DIMINAZEN ASETURAT KAMBING SAKIT-5.....	279
Lampiran 37	: PEMBERIAN BERULANG DIMINAZEN ASETURAT KAMBING SEHAT-1.....	280
Lampiran 38	: PEMBERIAN BERULANG DIMINAZEN ASETURAT KAMBING SEHAT-2.....	281
Lampiran 39	: PEMBERIAN BERULANG DIMINAZEN ASETURAT KAMBING SEHAT-3.....	282
Lampiran 40	: PEMBERIAN BERULANG DIMINAZEN ASETURAT KAMBING SEHAT-4.....	283
Lampiran 41	: PEMBERIAN BERULANG DIMINAZEN ASETURAT KAMBING SEHAT-5.....	284
Lampiran 42	: UJI HIPOTESIS PEROLEHAN WAKTU PENJAGAAN KADAR ANTAR KELOMPOK.....	285
Lampiran 43	: UJI HIPOTESIS KEBERADAAN SEROPOSITIF	285
Lampiran 44	: PERHITUNGAN PERKIRAAN WAKTU PENGOBATAN ULANG	286

DAFTAR SINGKATAN PENTING

ACDP	:	<i>Advisor Committee on Dangerous Pathogen</i>
ADME	:	<i>Absorpsi, Distribusi, Metabolisme, Ekskresi</i>
AIC	:	<i>Akaike Information Criteria</i>
AMP	:	<i>Adenosin mono phosphate</i>
AMSH	:	<i>Aerobic mitochondria shunt</i>
AO	:	<i>Acridine orange</i>
A-T	:	<i>Adenin-Thymin</i>
ATP	:	<i>Adenosin Tri phosphate</i>
AUMC	:	<i>Area under the moment curve</i>
AV	:	<i>Antigenic variation</i>
AVS	:	<i>Antigenic variation surface</i>
BAKITWAN	:	<i>Balai Penyakit Hewan</i>
BALITVET	:	<i>Balai Penelitian Veteriner</i>
bpb	:	<i>Base peak base</i>
BSA	:	<i>Bovine serum albumin</i>
BUN	:	<i>Blood ureum nitrogen</i>
BW	:	<i>Body weight</i>
CAT	:	<i>Computer assisted tomography</i>
CATT	:	<i>Card agglutination test</i>
CRD	:	<i>Cross reacting determinat</i>
DE52	:	<i>Diethyl cellulose</i>
DEAE	:	<i>Diethyl amino ethyl cellulose</i>
DHAP	:	<i>Dehydroxy aceton phosphate</i>
EDTA	:	<i>Ethylene diamin tetra acetic acid</i>
ELISA	:	<i>Enzym link immunosorbant assay</i>
EN	:	<i>Enolase</i>
EP	:	<i>End point</i>
FAVA	:	<i>Federation of asian veterinarian associations</i>
FBS	:	<i>Foetal bovine serum</i>
Fru-6-P (F6P)	:	<i>Fructose 6 phosphat</i>
G3PDH	:	<i>Glycerol 3 phosphate dehydrogenase</i>
G6P(Glc-6-P)	:	<i>Glucose 6 phosphat</i>
GA3P	:	<i>Glyceraldehyde 3 phosphate</i>
GAP	:	<i>Glyceraldehyde 3- phosphate</i>
GAPDH	:	<i>Glyceraldehyde 3 phosphate dehydrogenase</i>
G-C	:	<i>Guanin-Cytosine</i>
GK	:	<i>Glycerol Kinase</i>
Glc-6P	:	<i>Glucose 6 phosphate</i>
GPI	:	<i>Glycosyl phosphatidyl inositol</i>
GPI	:	<i>Glucose 6 phosphate isomerasi</i>
Hb	:	<i>Haemoglobin</i>
HE	:	<i>Haematoksilin eosin</i>
IFAT	:	<i>Indirect flourecent antibody test</i>
IgG	:	<i>Immunoglobulin gravidarum</i>
IgM	:	<i>Immunoglobulin maternal</i>
IM	:	<i>Intramuskular</i>
IP	:	<i>Intraperitoneal</i>
IV	:	<i>Intravena</i>
K. Bowman	:	<i>Kapsula Bowman</i>

KCKT	:	Kromatografi cair kinerja tinggi
K-DNA	:	<i>Kinetoplastide-Dioxyribonucleic acid</i>
KGSM	:	Kromatografi gas spektrum masa
KV	:	Koefisien variasi
LCL	:	<i>Lower control limit</i>
LDM	:	Lethal dosis median
LIT	:	<i>Liver infusion tryptose</i>
MAT	:	<i>Means avarage time</i>
MEM	:	<i>Minimum eagle media</i>
MRT	:	<i>Means residance time</i>
MTC	:	<i>Minimum (maintenance) therapeutc concentration</i>
NAD	:	<i>Nitrogen adenosin diphosphate</i>
NADH	:	<i>Nitrogen adenosin diphosphate hydrogenase</i>
PAE	:	<i>Post antibiotic effect</i>
PB PDHI	:	Pengurus Besar Perhimpunan Dokter Hewan Indonesia
PBG	:	<i>Phospat bufer glucose</i>
PBS	:	<i>Phospat bufer saline</i>
PCR	:	<i>Polymerase chain reaction</i>
PCV	:	<i>Package cell volume</i>
PE	:	Peranakan Etawa
PFK	:	<i>Phosphofructokinase</i>
PGK	:	<i>Phophoglycerat kinase</i>
PGM	:	<i>Phospho glycerate mutase</i>
PK	:	<i>Pyruvat kinase</i>
PMN	:	<i>Poly morpho nuclear</i>
Ppi	:	<i>Pirophospat inorganic</i>
ppp	:	<i>Penttose-posphat pathway</i>
PTS2	:	<i>N-terminal peroxisomal import signal</i>
PUSVETMA	:	Pusat Veterina Farma
PV	:	Program validasi
R5P	:	<i>Ribose 5-phosphate</i>
RIA	:	<i>Radio immunoassay</i>
RNA	:	<i>Ribonucleic acid</i>
Ru5P	:	<i>Ribulose 5 phosphate</i>
satuan kb	:	<i>Kilobite</i>
SGOT	:	<i>Serum glutamic oxaloacetic transaminase</i>
SGPT	:	<i>Serum glutamic pyruvic transaminase</i>
SPE	:	<i>Solid phase extraction</i>
SPF	:	<i>Spesific pathogen free</i>
SUV	:	Spektrofotometer ultra violet-visible
Sx0	:	<i>Vervahrensstandarabweichung</i> (Standard deviasi fungsi)
TIM	:	<i>Triose phosphate Isomerase</i>
Trip/ml	:	Tripanosoma/mililiter
UCL	:	<i>Upper control limit</i>
UV-Vis	:	<i>Ultra Violet visible</i>
V	:	Vena
VSG	:	<i>Variance surface glycoprotein</i>
VWD	:	<i>Variable wave length</i>
V _{x0}	:	<i>Vervahrensstandarabweichung</i> (Koefisien variasi dari fungsi)
WBF	:	<i>Whole blood film</i>

DAFTAR ARTI HURUF DAN ARTI LAMBANG PENTING

τ	: Interval waktu pemberian
Δ	: Segi tiga
β, λ_z	: Tetapan disposisi lambat
$\alpha, \lambda_1, \lambda_2$: Tetapan disposisi cepat/ Tetapan laju ke kompartemen 1 (λ_1) ke kompartemen 2 (λ_2).
Δ'_c	: Koefisien distribusi
A, B(C ₂ , C ₃), N, L	: Harga intersep setelah bertemu garis ordinat dari <i>slope</i> (disposisi cepat) setelah dikurangi harga intersep lain dari pertemuan <i>slope</i> berikutnya (disposisi cepat lainnya) dengan garis ordinat
AUC	: Area di bawah kurva
b	: Batas bawah interval klas
b ₁ , b ₂	: Harga beda atas (1) beda bawah (2)
C	: Kadar obat hasil observasi
\hat{C}	: Kadar obat hasil estimasi
C(C ₁), M	: Harga intersep dari <i>slope</i> disposisi lambat dengan garis ordinat
Cl	: Kliren(s) = bersihan
C _{maks}	: Kadar obat puncak / maksimum
C _p (t), C _p ⁰	: Konsentrasi obat dalam darah pada waktu tertentu, pada waktu = 0 (satuan waktu)
Cyde, K(a-k), DR(1-3), K(1-7), P(1-5)	: Penandaan subyek
D	: Dosis
D*	: Dosis muatan
E	: Harga kesalahan yang dapat ditoleransi
F _a	: Fraksi obat terabsorpsi
f _i	: Frekuensi
IM, IP, IV	: Parenteral ekstravaskular (IM, IP), parenteral intravaskular (IV)
K _a	: Laju absorpsi
K ₁₂ , K ₂₁ , K ₁₃	: Laju transfer antar kompartemen
M _o	: Modal
N	: Jumlah data/sampel
ODS C18	: Oktadesil silan
p	: Jumlah klas
P	: Kemurnian tinggi (<i>pure</i>)
R	: Rasio dosis
Re	: $\sum_{i=1}^N W_i \cdot (\hat{C} - C_i)^2$
S	: Simpang baku
S _a , S _b	: Simpang baku (S) perihal A dan B
S _y	: Simpang baku residual rerata dari garis regresi
t	: Waktu
T = 0 → ∞	: Waktu t=0 hingga t- tak berhingga
T _{1/2 el} (β)	: Waktu paruh (T _{1/2}) eliminasi, (T _{1/2α}) = waktu paruh absorpsi, T _{1/2} (λ ₁ , λ ₂ , λ ₃) = waktu paruh (λ ₁ , λ ₂ , λ ₃)
T _{maks}	: Waktu pencapaian kadar obat tertinggi

- Vc** : Volume distribusi (Vd) pada kompartemen sentral(Vds),
Vdss = Vd tunak
- Wi** : Faktor pembobotan (*weighted factor*)
- Vx0** : $\frac{Sx0}{x} \cdot 100\%$, $x = kadar$
dan
 $Sx0 = \frac{Sy}{b}$
- $Sy = \sqrt{\frac{\sum (Yi - Ypengamatan)^2}{N - 2}}$, untuk $Yi = a + bXi$
- Zβ** : Tingkat kesalahan
- Z_{1 - (α/2)}** : Tingkat kepercayaan Z_α



BAB 1 PENDAHULUAN**1.1 Latar Belakang**

Masalah tripanosomiasis pada ternak di Indonesia sejak pertama kali ditemukan wabah (1897) masih tetap menjadikan keprihatinan nasional (Balai Penelitian Veteriner - Pusat Penelitian dan Pengembangan Peternakan, 1993; Soeharmi *et al.*, 2002).

Sebagai gambaran pada tahun 1998 ditemukannya kasus 108 ekor temak tertular di wilayah Pemerintahan Banyuwangi, Magetan, Ponorogo, Ngawi (Dinas Peternakan Propinsi Jawa Timur, 1998). Disamping itu pada tahun 1999 ditemukan 10 kasus penularan di Kabupaten Pangkep, Maros dan Bantaeng (Sulawesi Selatan) terutama sapi potong (Balai Karantina Hewan Ujung Pandang, 1999).

Secara umum tindakan eradikasi tripanosomiasis masih ditunjukkan pada upaya kemoterapi terhadap temak tertular disertai upaya pemutusan penularan induk semang antara (*The Programme Against African Trypanosomiasis*, 1996^a; *The Programme Against African Trypanosomiasis*, 1996^b; Cross, 2001; Seed 2001).

Tindakan kemoterapi di Indonesia memasuki tahun 1999 telah dirasakan adanya kendala dimulai sejak tak diproduksinya kemoterapi andalan untuk *T. evansi* isolat Indonesia yaitu suramin (Lazuardi, 1998; Lazuardi, Soepartono, 1999). Sementara pengembangan kemoterapi antitripanosoma baru dipasaran untuk temak tak ditemui kendati dalam laboratorik telah banyak dikembangkan senyawa baru

(Kaminsky, Brun 1998; Bacchi *et al.*, 1998). Kendala tambahan adalah telah lama diketahui bahwa tidak ada jaminan kemoterapi yang beredar dipasaran mampu bersifat tripanosidal terhadap *T. evansi* isolat Indonesia.

Pemerintah Indonesia tahun 1999 merekomendasikan dua nama kemoterapi alternatif yaitu isometamidium klorida dan diminazen aseturat (Direktur Bina Kesehatan Hewan, 1999).

Isometamidium klorida sejak tahun 1989 diketahui secara *in vivo* tak mampu bersifat tripanosidal untuk isolat Indonesia khususnya pemberian dosis lazim 2-3 mg/kg berat badan (Prastyawati *et al.*, 1989; Prastyawati *et al.*, 1992). Roostantia *et al.*, (2003) memaparkan dibutuhkan kadar ± 560 kali kadar lazim (11,2 $\mu\text{g/ml}$) untuk membunuh *T. evansi* isolat Indonesia secara *in vitro*. Senyawa ini dikenal tidak stabil pada suasana asam sehingga akan pecah menjadi ethidium klorida dan 3-amino-fenildiazonium (Perschke, Vollner, 1985). Sifat tersebut tak menguntungkan dalam segi kerja obat, mengingat tubuh penderita *trypansomiasis* mengalami asidosis. Pada keadaan demikian kemampuan tripanosidal tidak akan ditemui (Kinabo *et al.*, 1991; Tettey *et al.*, 1998; Tettey *et al.*, 1999). Terkait beberapa kelemahan isometamidium klorida seperti uraian di atas maka pilihan alternatif adalah diminazen aseturat.

Diminazen aseturat adalah kemoterapi parasit darah eukaryot dikenal sejak tahun 1955 sebagai antibabesia. Catatan awal penggunaan diminazen aseturat di Indonesia hingga saat ini masih

belum banyak diketahui, kendati secara laboratorik pernah dicobakan (Wardiarto, 1983). Sejak pertamakali dipasarkan banyak harapan ditujukan sebagai antitripanosoma alternatif untuk mengatasi masalah resistensi parasit terhadap isometamidium klorida.

Kajian uji klinik menunjukkan diminazen aseturat memiliki kemampuan tripanosidal terhadap kerabat *T. congolense* (Sutherland *et al.*, 1991; Mamman *et al.*, 1995^a).

Secara laboratorik upaya peningkatan kinerja tripanosidal diminazen aseturat, telah lama dilakukan diantaranya melalui penentuan regimen dosis baru, dan hal tersebut pernah dilakukan pada kambing (Mamman *et al.*, 1995^b). Regimen dosis dimaksudkan adalah analogi paparan dari Nanizar Zaman-Joenoos (1998) yaitu berkaitan dengan pilihan bentuk sediaan, jumlah, waktu dan cara pemberian disesuaikan kondisi penderita. Upaya tersebut amat memungkinkan mengingat diminazen aseturat memiliki rentang terapi luas berkisar 3,5-25 mg/kg berat badan (Mamman *et al.*, 1993; Mamman *et al.*, 1995^a, *British Veterinary Association*, 2001).

Parasit *Tripanosoma* dikenal memiliki banyak spesies dan di Indonesia sejak pertama kali ditemukan (1897), diidentifikasi sebagai *T. evansi* dengan \pm 300 isolat tersebar di berbagai daerah.

Gejala patognomonik di awal infeksi tak begitu khas namun dampak parasitemia lebih lanjut adalah menyerang sistem haemopoetik dan berimplikasi haemoglobinemia dengan manifestasi anemia (*The manual of tropical veterinary parasitology*, 1990).

Implikasi lanjutan adalah hipoproteinemia sehingga terjadi penurunan jumlah plasmabumin dan berpengaruh terhadap perolehan kadar terapi (Lazuardi, 1998).

Parasit *T. evansi* dikenal memiliki keistimewaan yaitu dilindungi protein permukaan (*Variance Surface Glycoprotein*) dan mampu membuat kopi 10^7 protein permukaan dalam waktu singkat. Fenomena protein permukaan diperkirakan mampu menimbulkan perbedaan keganasan tiap individu parasit bahkan mampu mengubah keganasan setiap waktu (Donelson, 1988; Artama *et al.*, 1992). Keistimewaan tambahan adalah dalam jumlah kecil (1-5%) mampu bermigrasi dari aliran darah ke dalam organ tubuh (Sudarto *et al.*, 1990). Kemampuan mengubah-ubah protein permukaan dan bermigrasi, menjadikan tidak mudahnya kemoterapi membunuh kerabat *T. evansi*. Fenomena itu akan memunculkan kerabat tripanotoleran (Urquhart *et al.*, 1994).

Dalam menyikapi perilaku kerabat *T. evansi* pilihan paling tepat pada strategi penentuan kembali regimen dosis baru kemoterapi antitripanosoma adalah pemberian berulang. Silayo *et al.*, (1992) menggambarkan pemberian diminazen aseturat berulang mampu menekan 50 % infeksi *T. congolense* pada kambing.

Beberapa pandangan baru menganjurkan strategi pengobatan ditujukan mendapatkan kadar tripanosidal sesegera mungkin melalui dosis muatan dan mempertahankannya dalam waktu tertentu melalui dosis penjagaan. Lebih lanjut Bockzon (1995) memaparkan tujuan

mendapatkan kadar tripanosidal sesegera mungkin dimaksudkan agar kemoterapi langsung berinteraksi dengan target spesifik parasit. Upaya mempertahankan kadar terapi dalam waktu tertentu ditujukan untuk memperlama ketersediaanhayati obat sehingga menimbulkan ancaman terus menerus. Bahkan Kageruka *et al.*, (1996), memaparkan pentingnya konsep ketersediaanhayati obat dalam jangka lama melalui bantuan senyawa lepas lambat *poly(d-lactide)* dan *poly-(d,l-lactide-co-glicolide)* sehingga berdaya tripanosidal. Konsep ketersediaanhayati kecukupan kadar berlangsung lama, diharapkan berinteraksi dengan C-terminal *cystein* asam inti (De Souza, 1989; Docampo, 2001). Ditinjau konsep pencapaian kadar sesegera mungkin melalui dosis muatan analogi paparan Shargel, Yu (1999) dan Ritschel (1992), dapat dimungkinkan bila plasmabumin penderita di awal infeksi memiliki jumlah cukup. Sedangkan pemberian dosis penjagaan dapat dilakukan namun seperti paparan Soebito, Watimena (1987) harus disesuaikan kondisi penderita.

Didasarkan masalah tersebut di atas maka dilakukan penelitian dalam rangka penetapan regimen dosis berdaya tripanosidal. Dalam pelaksanaannya temak yang di pilih adalah kambing Peranakan Etawa (PE) , didasarkan pertimbangan mampu mewakili kelompok temak ruminansia. Jenis parasit adalah *T. evansi* isolat Bangkalan dengan pertimbangan merupakan salah satu kerabat tripanosoma dengan keganasan tinggi (Prastyawati *et al.*, 1988).

1.2 Rumusan Masalah

1. Bagaimana rancangan regimen dosis diminazen aseturat yang bersifat tripanosidal pada kambing tertular *T. evansi* isolat Bangkalan
2. Seberapa aman dampak toksisitas regimen dosis diminazen aseturat hasil rancangan yang digunakan pada kambing penderita *T. evansi* isolat Bangkalan.
3. Apakah benar rancangan regimen dosis yang ditemukan dapat menghasilkan waktu lebih dari 24 jam dalam mempertahankan kadar terapi

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan umum

Menetapkan regimen dosis tripanosidal diminazen aseturat yang aman untuk pengobatan pada kambing penderita *T. evansi* isolat Bangkalan

1.3.2 Tujuan khusus

1. Menentukan kadar minimum tripanosidal *in vitro*
2. Menetapkan jumlah parasit yang dapat menimbulkan parasitemia pada kambing PE
3. Menentukan parameter dan variabilitas kinetik diminazen aseturat dosis tunggal

4. Menetapkan hubungan dosis diminazen aseturat dan respon tripanosidal pemberian tunggal
5. Menyusun regimen dosis pemberian berulang.
6. Melakukan evaluasi respon klinik eliminasi parasit melalui pemeriksaan ulas darah, uji biologis dan seroparasitologi
7. Melakukan evaluasi keamanan pemberian regimen dosis berulang melalui pengamatan gejala toksik dan struktur mikroskopis sel hati, ginjal
8. Melakukan evaluasi perolehan waktu mempertahankan kadar terapi

1.4 Manfaat Penelitian

Segi penerapan ilmu, dapat diaplikasikan untuk pengobatan kasus penularan *T. evansi* isolat Bangkalan pada kambing PE. Kemanfaatan lain adalah dapat digunakan sebagai alternatif strategi pengobatan pada kasus-kasus penularan *T. evansi* isolat asal Indonesia yang sering menyerang kerabat ruminan lain seperti sapi, kerbau, kuda.

Segi pengembangan ilmu, penelitian ini bermanfaat sebagai sumber informasi mengenai perwatakan kinetik diminazen aseturat pada kambing PE. Kemanfaatan lain adalah dapat digunakan sebagai model terapi pemberian kemoterapi antiparasit bagi pemberantasan kasus penularan kerabat kinetoplastid pada manusia.

BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

2. 1 Diminazen aseturat

Diminazen aseturat adalah senyawa diamidin aromatik turunan dari suatu senyawa sintesis (surfen-c), dan pertama kali disintesis di Jerman Barat untuk pengobatan kasus babesiosis pada hewan (Babesan[®]).

Molekul diminazen aseturat dipasarkan dalam bentuk garam diaseturat mengandung dua bagian amidinofenil yang dihubungkan dengan suatu jembatan triazen seperti tampak pada Gambar 2.1 (Peregine dan Mamman, 1993 mengutip dari Jensch, 1958).

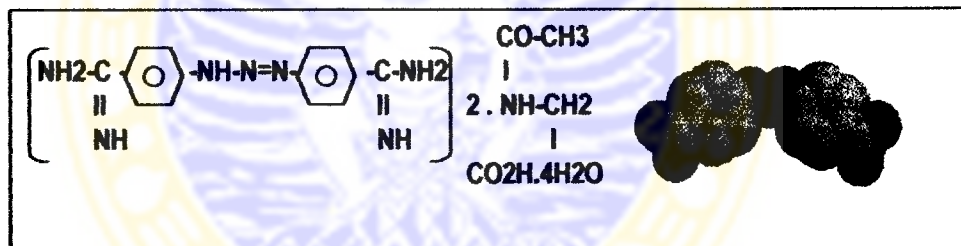
Diminazen aseturat terdiri dari unsur $C_{22}H_{29}N_9O_6$ dan memiliki banyak nama sinonim diantaranya :

1. *diminazene diaceturate*
2. *4,4'-(diazamino)-dibenzamidine diaceturate*
3. *1,3-bis (p-amidinophenyl) triazene bis (N-acetylglycine)*
4. *4,4'-diamidinodiazaminobenzene diaceturaye*
5. *p.p'-diguanyldiazaminobenzene diaceturate*

Produk komersial diminazen aseturat memiliki banyak nama diantaranya Berenil[®], Azidin[®], Veriben[®] dan Ganasag[®] dengan bentuk sediaan parenteral (intramuskular).

2.1.1 Sifat fisikokimia

Diminazen aseturat merupakan serbuk berwarna kuning mengandung unsur C 51,25 %, H 5,67 %, N 24,45 %, O 18,62 %. Berat molekul 515,45 dan memiliki sifat titik leleh pada suhu 217 °C. Kelarutan diminazen aseturat dalam air 1 : 14 (20 °C), sedikit larut dalam alkohol, sukar larut dalam eter atau kloroform. Diminazen aseturat, dapat dilarutkan dalam air hingga 7 %, dan dalam larutan hanya dapat tersimpan selama 2-3 hari pada suhu kamar namun dalam suhu dingin tetap stabil hingga 30 hari. (Clarke, 1971; Budavari *et al.* 1989; *The manual of tropical veterinary parasitology*, 1990).



Gambar 2.1. Struktur molekul diminazen aseturat
(Diambil dari Peregrine dan Mamman, 1993)

Pengamatan dengan spektrofotometer UV-Vis menghasilkan absorban maksimum pada panjang gelombang 258 nm dalam larutan asam sulfat (0,1 N). Dalam air menghasilkan absorban maksimum pada panjang gelombang 370 nm. Pemeriksaan menggunakan spektrofotometer infra merah memberikan spektrum dengan puncak-puncak pada bilangan gelombang 1610 cm^{-1} , 1635

cm^{-1} , 1588 cm^{-1} , 1171 cm^{-1} , 1267 cm^{-1} , 1198 cm^{-1} (Clarke, 1971; Moffat, 1986).

2.1.2 Penggunaan klinik

Diminazen aseturat sejak pertama kali dipasarkan berhasil dilakukan pengembangan kegunaan antara lain untuk antiprotozoa interseluler kerabat flagelata seperti tripanosomiasis dan leismaniasis. Kegunaan lain adalah sebagai antimikroba yang diterapkan tahun 1975 (Budavari *et al.*, 1989).

Pengembangan penggunaan diminazen aseturat lain adalah bersama-sama dengan sediaan steril parenteral isotonik dan heparin dimanfaatkan sebagai anti-tick borne blood (*Cytauxzoon felis*) penyebab kematian pada kucing (Greene *et al.*, 1999).

Penggunaan diminazen aseturat sebagai antitripanosoma di beberapa wilayah endemik di dunia seperti bagian timur Zambia, Etiopia, lebih berkhasiat dari pada isometamidium klorida. Sedangkan tinjauan mengenai persentase jumlah pengguna diminazen aseturat dibanding isometamidium klorida dalam satu tahun setiap hewan, cukup tinggi (Rowlands *et al.*, 1999; Van den Bossche *et al.*, 2000).

Penggunaan klinik diminazen aseturat di Indonesia sejak tahun 1983 telah mulai dicobakan terhadap kasus tripanosomiasis pada domba kendati terbatas pada tingkat laboratorik. Dalam penelitian tersebut dinyatakan bahwa kemampuan diminazen aseturat

sebagai antitripanosoma masih diragukan khususnya terhadap *T. evansi* isolat Jawa Tengah (Wardiarto, 1983). Peredaran diminazen aseturat di Indonesia sejak tahun 1985 dipasarkan terbatas untuk kasus piroplasmosis dan trikomoniasis pada ternak (Direktorat Kesehatan Hewan, 1985).

Tinjauan mengenai kemampuan tripanosidal pada umumnya kerabat *Tripanosoma* menunjukkan bahwa batas minimum daya bunuh diminazen aseturat secara *in vitro* terhadap *T. congolense*, adalah 1 µg/ml (inkubasi di atas 6 jam). Sedangkan pada kadar 10 µg/ml mampu menghambat pertumbuhan *T. congolense* inkubasi di atas 30 menit dan akan menghasilkan daya bunuh bila di inkubasi lebih dari 6 jam (Kaminsky *et al.*, 1994). Penggunaan produk komersial diminazene aseturat (Veriben[®]) pada tindakan eradikasi kasus tripanosomiasis oleh *T. evansi* isolat Vietnam, menunjukkan kemampuan tripanosidal hampir setara dengan Suramin[®] (Le *et al.*, 1998).

2.1.3 Mekanisme aksi

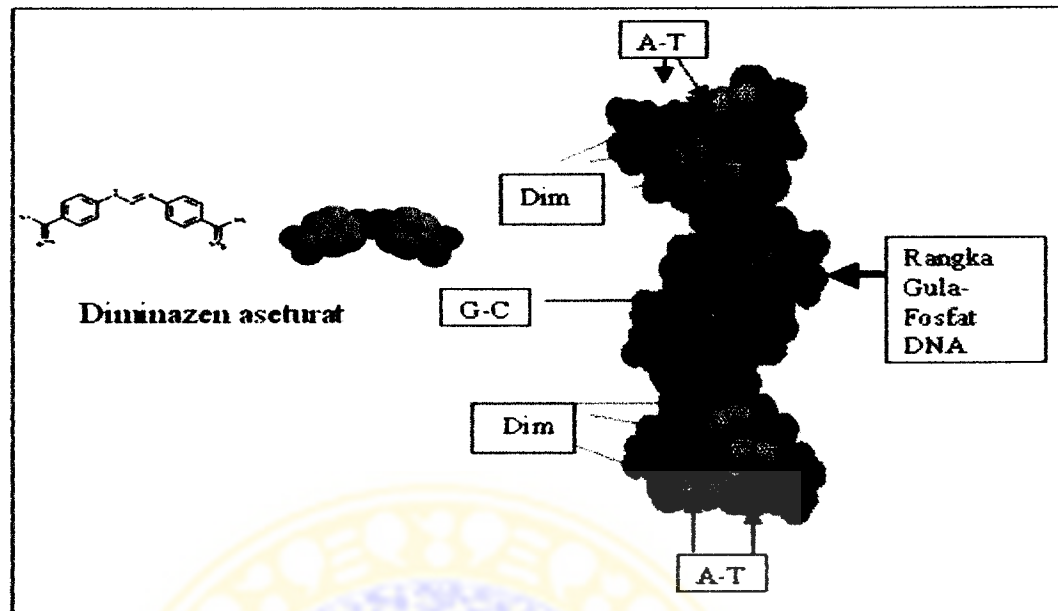
Pendapat mengenai mekanisme aksi diminazen aseturat hingga akhir tahun 2000 masih bersifat kontroversi, namun diperkirakan melakukan interaksi spesifik di bagian sedikit celah *base pair* DNA. Bagian dimaksudkan adalah daerah dengan kandungan tinggi unsur *adenin-thymin* (A-T). Tempat-tempat tersebut akan ditemui di

daerah celah kecil 5'-AATT-3' dengan jenis ikatan elektrostatik dan hidrogen (Gambar 2.2).

Dampak ikatan tersebut adalah menghambat sintesis primer rantai tunggal RNA sehingga menghasilkan akumulasi replikat intermediet. Pada keadaan demikian akan menghambat replikasi k-DNA. Pendapat lain adalah penghambatan sistem kendali DNA dan berakibat penghambatan dalam sintesis mitokondria tipe II topoisomerase yang khas dimiliki oleh sel parasit eukaryot kerabat haemoflagelata *Tripanosoma*. Dua pendapat tersebut dapat disimpulkan bahwa diminazen aseturat pada akhirnya menghambat bagian kecil k-DNA dengan pengaruh terhadap biosintesis sel (Peregrine, Mamman, 1993). Peneliti lain yaitu Trent *et al.*, (1996) dan Victor *et al.*, (1999) menguraikan lebih lanjut tentang letak ikatan diminazen aseturat dengan bagian DNA sel parasit termasuk ciri khas bagian sasaran pengikatan. Dalam uraian tersebut dinyatakan bahwa ikatan diminazen aseturat dapat mengarah pada pinggir hingga bagian tengah pasangan komplementer asam inti DNA *Tripanosoma*.

Pendapat ke dua adalah penghambatan akan terjadi pada sintesis [³H]-Hipoksantin yang dikendalikan oleh genom rantai ganda asam deoksiribonukleat dan khas dimiliki kerabat *T. evansi* (Bacchi *et al.*, 1998).

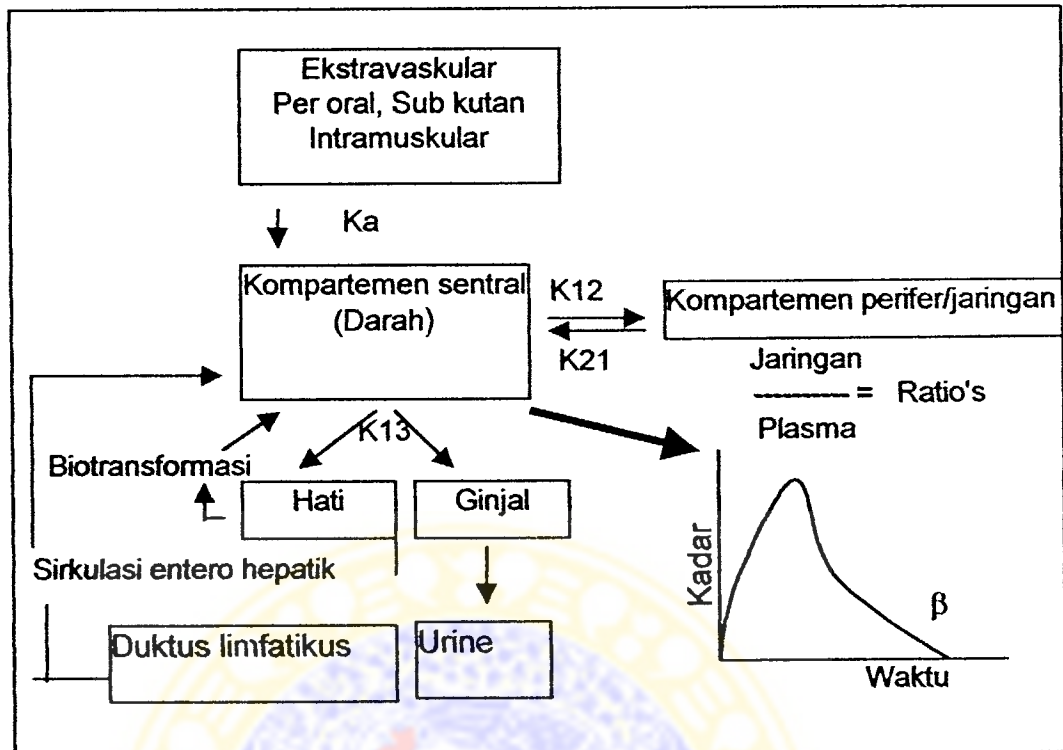




Gambar 2.2. Mekanisme aksi diminazen aseturat pada k-DNA mitokondria kerabat *Trypanosoma*

2.1.4 Farmakokinetik

Penelitian tentang kinetika diminazen aseturat pada ternak sehat pada umumnya menunjukkan perwatakan linier dua kompartemen (Gilbert, Newton, 1982; Aliu *et al.*, 1993; Mamman *et al.*, 1993; El Banna *et al.*, 1999). Makna linier dimaksudkan adalah tetapan laju obat dalam tubuh tidak bergantung dosis (Soebito dan Watimena, 1987; Martinez, 1998). Bila kemoterapi tersebut mengikuti dua kompartemen terbuka maka gambaran perjalanan nasib obat dalam tubuh seperti pada Gambar 2.3a dan Gambar 2.3b (Klotz, 1983; Mercer, 1984).



Gambar 2.3a Kinetika obat dua kompartemen terbuka ekstrasvaskular, K_a = Tetapan laju absorpsi, K_{12} , K_{21} = Tetapan laju antar kompartemen sentral ke perifer bolak balik, K_{13} = Tetapan laju eliminasi, β = Tetapan laju disposisi lambat,

Mamman *et al.*, (1995^a), dan beberapa peneliti pernah menemukan pola kinetik tiga kompartemen terutama pada subyek laboratoris seperti tikus. Pengguna model analisis kinetika tiga kompartemen dibanding dua kompartemen, amat jarang. Bahkan Paramjit *et al.*, (2002), Zhang dan Bourdichon (2002), menetapkan dua kompartemen sebagai model pengamatan baku perawatan kinetika diminazen aseturat. Perawatan kinetik dua kompartemen terbuka dirumuskan pada persamaan 1, dimana dapat terjadi $K_a > \alpha > \beta$ (Allen *et al.*, 1982).

Gambar 2.3a berasumsi keseimbangan terjadi antara kompartemen sentral ke kompartemen perifer pasca fase absorpsi, berlangsung seketika dan dikenal sebagai fase distribusi. Pasca kompartemen perifer terdifusi sempurna akan segera terjadi fase eliminasi. Asumsi tambahan lain adalah nilai jumlah tetapan laju antar kompartemen ($K_{12}+K_{21}$) berharga lebih kecil 20 kali tetapan laju eliminasi (Notari, 1987).

Persamaan 1.

$$Cp(t) = B.e^{-\beta t} + A.e^{-\alpha t} - C_p^0.e^{-Ka t}$$

Dalam persamaan 1, kadar obat dalam darah (C_p) dalam suatu waktu (t) dapat diperhitungkan bila diketahui harga tetapan kecepatan disposisi lambat (β), tetapan kecepatan disposisi cepat (α). Harga B merupakan intersep ekstrapolasi ke belakang monoeksponensial garis menurun terhadap garis ordinat dan A intersep monoeksponensial garis α . Parameter lain adalah harga laju absorpsi (K_a) serta C_p^0 yang merupakan harga intersep slop K_a dengan ordinat (Ritschel, 1992; Allen *et al.*, 1982; Lazuardi, Soepartono, 1999). Secara terpisah persamaan 1, dapat dipecah menjadi persamaan 2 dan persamaan 3.

Persamaan 2.

$$M = B. e^{-\beta t},$$

Persamaan 3.

$$L = A. e^{-\alpha t}$$

Persamaan 4.

$$N = Cp^0 \cdot e^{-Ka \cdot t}, \quad (Cp^0 = B + A)$$

Secara residual sejumlah data yang bakal dihitung untuk mendapatkan persamaan M, L dan N ditentukan melalui pengamatan liku kinetik obat ekstrasvaskular rajah grafik semi log. Harga K21, K13, K12 dapat ditentukan melalui persamaan 5, 6, 7.

Persamaan 5.

$$K_{21} = \frac{(M \cdot \alpha + L \beta)}{M + L}$$

Persamaan 6.

$$K_{13} = \frac{(\alpha \cdot \beta)}{K_{21}}$$

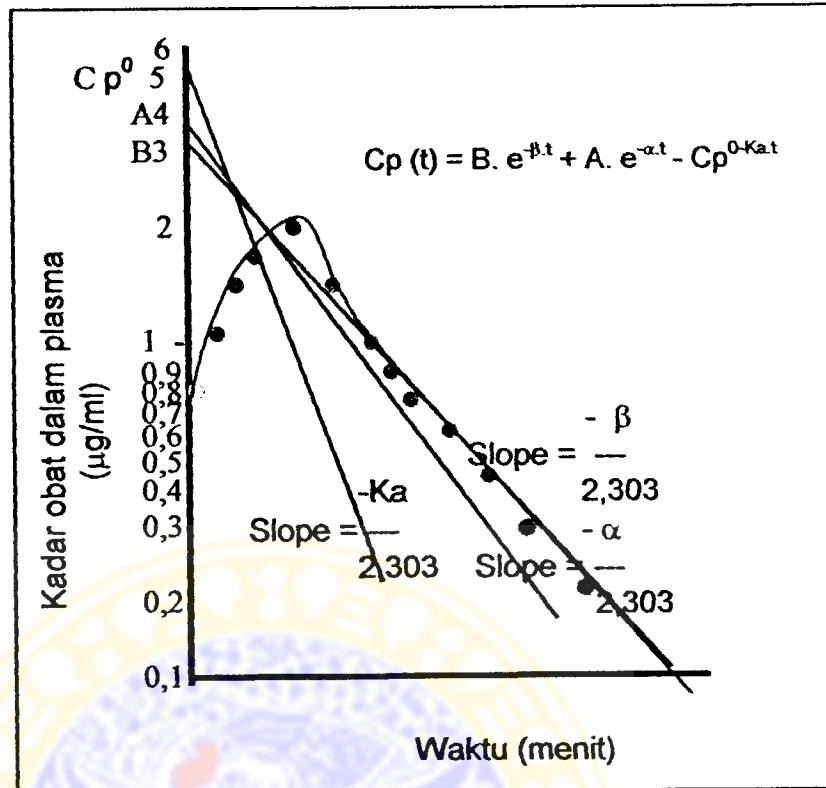
Persamaan 7.

$$K_{12} = \alpha + \beta - K_{21} - K_{13}$$

Penghitungan kadar obat dalam darah (Cp) bila dikaitkan volume distribusi sentral (Vc); fraksi obat terabsorpsi (Fa) dosis (D), seperi tampak dalam persaman 8.

Persamaan 8.

$$Cp = \frac{Ka \cdot Fa \cdot D}{Vc} \left[\left\{ \frac{K_{21} - \alpha}{(Ka - \alpha)(\beta - \alpha)} \right\} \cdot e^{-\alpha \cdot t} + \left\{ \frac{K_{21} - \beta}{(Ka - \beta)(\alpha - \beta)} \right\} \cdot e^{-\beta \cdot t} \right] + \left\{ \frac{K_{21} - Ka}{(\alpha - Ka)(\beta - Ka)} \right\} \cdot e^{-Ka \cdot t}$$



Gambar 2.3b. Profil farmakokinetik kadar obat dalam darah ($\mu\text{g/ml}$) vs. waktu (menit) dua kompartemen terbuka ekstrasvaskular
 K_a = tetapan kecepatan absorpsi; α = tetapan disposisi cepat, β = tetapan disposisi lambat; B = intersep monoeksponensial garis β , A = intersep monoeksponensial garis α , C_p^0 = Kadar obat pada waktu tertentu

Analisis rajah grafik semilog cuplikan data suatu obat, tidak hanya mampu memperkirakan perjalanan kinetik suatu obat tetapi mampu memperkirakan pencapaian waktu maksimum (T_{maks}) dan kadar maksimum suatu obat (C_{maks}). Kadar maksimum suatu obat pemberian ekstrasvaskular, dapat diperhitungkan dengan cara ke dua yaitu ditemukannya nilai pencapaian waktu maksimum (T_{maks}), dan diterapkan pada persamaan 1 dan 8.

Khusus penggunaan persamaan 8 harus diketahui fraksi % terabsorpsi hasil penelitian terdahulu. Aliu, Ødegard (1985),

menyatakan nilai F_a diminazen aseturat pada domba pemberian intramuskular mencapai $95,1 \pm 23,21$ %, dengan demikian banyak peneliti menggunakan harga $F_a = 0,951$ (Gummow *et al.*, 1994).

Harga F_a amat diperlukan manakala dilakukan penilaian secara hipotetik terhadap kualitas penyebaran obat dalam aliran darah tubuh (volume distribusi), berdasarkan temuan aktual harga kadar obat dalam plasma. Volume distribusi kompartemen sentral (V_c) obat-obat dengan watak dua kompartemen terbuka ekstravaskular, dapat dihitung dengan persamaan 9 ($C_p^t = M+L$).

Persamaan 9.

$$V_c = F_a \cdot D / C P^t$$

Kemampuan lain rajah grafik semilog adalah sebagai dasar penghitungan parameter *Area Under The Curve* (AUC) secara Trapezoidal. Penilaian AUC membutuhkan dua tahapan penghitungan yaitu AUC di daerah AUC^{0-t_n} dan di daerah $AUC^{t_n-\infty}$ melalui persamaan 10 (Ritschel, 1992). Sehingga seluruh penghitungan $AUC^{0-\infty}$ merupakan jumlah AUC^{0-t_n} secara trapezoidal di tambah $AUC^{t_n-\infty}$ melalui persamaan 11 ($\beta =$ slope fase eliminasi). Harga AUC bersama-sama dengan harga F_a , akhirnya diperlukan untuk menghitung nilai hipotetik hilangnya obat dari tubuh akibat aktivitas eliminasi (Klirens). Klirens obat dalam tubuh (Cl) dapat diperhitungkan menggunakan persamaan 12 (Shargel dan Yu, 1999).

Parameter AUC suatu obat dapat dimanfaatkan untuk menilai *Means Residence Times (MRT)* suatu obat melalui persamaan 13 dimana AUMC seperti dalam persamaan 14 dan AUC diperhitungkan secara trapezoidal (Hekman dan Van Ginneken, 1982; Shargel dan Yu, 1999; Eisler, 1996).

Persamaan 10.

$$AUC_{t^{tn} \rightarrow \infty} = C_p^{tn} / \beta$$

Persamaan 11.

$$AUC^{0 \rightarrow \infty} = AUC_{t^{0 \rightarrow tn}} + AUC^{tn \rightarrow \infty}$$

Persamaan 12.

$$CI = \frac{Fa.D}{AUC^{0 \rightarrow \infty}}$$

Persamaan 13.

$$MRT = AUMC/AUC$$

Persamaan 14.

$$AUMC^{0 \rightarrow \infty} = \sum_{i=0}^n \left[\frac{C}{\lambda_1^2} \right]$$

Penelitian tentang pola ADME diminazene aseturat mulai dikembangkan antara tahun 1976 terhadap sebagian ternak ruminansia kecil (domba, kambing).

Pemberian ekstravaskular (intramuskular) diminazene aseturat pada umumnya ternak ruminansia (domba, kambing sapi), akan cepat diabsorpsi.

Distribusi diminazen aseturat pada tubuh berlangsung luas, bahkan beberapa kasus ditemukan mampu menembus sawar otak.

Metabolisme diminazen aseturat dalam tubuh hingga saat ini masih belum jelas, namun diperkirakan sebagian besar terjadi melalui reaksi konjugasi. Bila dikaitkan dengan prinsip metabolisme pada umumnya obat, aktivitas berbagai fase metabolisme, bertujuan menjadikan metabolit makin polar. Sehingga metabolit lebih mudah dikeluarkan melalui urin. Pengeluaran melalui feses dapat terjadi bila metabolit akhir bersifat lipofilik sehingga sering ditemui metabolit mengikuti siklus metabolisme entero hepatic (Testa, Jenner, 1976; Gibson, Skett, 1984).

Reaksi metabolisme awal terjadi melalui fase II dengan N-asetiltransferase sebagai enzim konjugat. Sebagian besar bentuk utuh akan terpecah menjadi bagian aromatik diamidin dengan sifat lebih polar. Sebagian kecil metabolit melalui *mix-fungtion oxidation* P-450 endoplasmik retikulum sel tubuh akan dipecah melalui mekanisme aromatik hidroksilasi.

Ekskresi diminazene aseturat sebagian besar dikeluarkan melalui urine dan hanya sebagian kecil mampu dikeluarkan melalui feses (Gillbert, Newton, 1976).

Aliu dan Ødegaard (1985) merupakan kelompok peneliti pertama studi kinetik diminazen aseturat pada domba dengan hasil tampak dalam Tabel 2.1, Tabel 2.2. Beberapa tahun

kemudian Aliu (1989) kembali menguraikan perwatakan kinetik sediaan komersial diminazen aseturat (Berenil[®] dan Ganaseg[®]) pemberian intramuskular dan intravena. Hasil penelitian menunjukkan waktu penjagaan kadar terapi sediaan Berenil[®] mampu mencapai 35,3 jam. Harga fraksi terabsorpsi (F_a) sediaan Ganaseg[®] pada domba mampu mencapai 95 %.

Data kinetik kambing dan domba menyusui pemberian intramuskular 3,5 mg/kg berat badan menurut El Banna *et al.*, (1999) cukup bervariasi. Harga C_{maks} kambing 7 $\mu\text{g/ml}$, sedangkan pada domba 8,11 $\mu\text{g/ml}$. Harga $T_{1/2}$ el kambing 16,54 jam, sedangkan pada domba 18,8 jam. T_{maks} kambing dapat tercapai dalam 0,92 jam pasca penyuntikan sedangkan pada domba dalam 1,12 jam. Ekskresi dalam susu dapat ditemukan 10 menit pasca penyuntikan pada ke dua spesies, dan akan terus ditemukan antara 5 dan 6 hari. Kadar temuan diminazen aseturat pada susu kambing lebih rendah dari pada domba.

Model kinetik yang ditemukan pada anak sapi pemberian intravena maupun intramuskular (dosis 3,5 mg/kg berat badan) dapat dipelajari menggunakan model konsep non-linier persamaan tiga eksponensial. Harga $T_{1/2el}$ adalah 31,7 jam, sedangkan Cl $1,74 \pm 0,40$ ml/min/kg. Rasio ikatan diminazen aseturat dengan sel darah merah atau plasma adalah $0,3 \pm 0,15$. Nilai *in vitro* ikatan obat dengan plasma sapi diperkirakan antara 38,01-91,10 % (Aliu *et al.*, 1993).

Tabel 2.1 Data kinetik diminazen aseturat domba Rams

Data kinetik	Rerata	Galat baku	Rentang
Ka (/jam)	8,471	1,65	7,354-10,892
T1/2 α (menit)	5,03	0,85	3,82-5,66
Tmaks (menit)	31,25	10,31	20-45
Cmaks (ug/ml)	6,71	0,58	6,30-7,57
MAT (jam)	5,83	1,61	4,43-8,11
F (%)	95,10	23,21	71,95-119,93
AUC _{∞} IV (jam x mg/l)	30,07	2,33	27,02-32,65
AUC _{∞} IM (jam x mg/l)	62,09	11,26	49,45-75,71
AUMC _{∞} (Jam ² x mg/l), IV	250,79	28,32	213,86-277,39
AUMC _{∞} (Jam ² x mg/l), IM	888,86	234,30	633,28-1110,09
MRT (jam), IV	8,33	0,48	7,92-8,93
MRT (jam), IM	14,16	1,55	12,40-16,02
Vdss (L/Kg), IV	0,56	0,04	0,52-0,60
Vdss (L/Kg), IM	0,76	0,18	0,59-1,02
Cl (ml.Kg/menit),IV	1,11	0,09	1,02-1,23
Cl (ml.Kg/menit),IM	0,89	0,14	0,73-1,06

Diambil dari Aliu dan Ødegaard (1985).

Rute intramuskular 3,5 mg/kg berat badan; intravena 2,5 mg/kg berat badan, n = 4 ekor. Ka : Laju absorpsi, T1/2 α : waktu paruh absorpsi, Tmaks = waktu maksimum, Cmaks = kadar maksimum, MAT = rerata rentang waktu, Fa = fraksi obat terabsorpsi, AUC, AUMC = area di bawah kurva/rerata kurva, MRT = rerata waktu ketersediaan obat, Vdss = vol. distribusi tunak, Cl = kliren

Studi pada sapi menunjukkan kinetika diminazen aseturat (Veriben[®] dan Berenil[®]) dapat dipelajari menggunakan dua kompartemen terbuka. Harga Cmaks ($\mu\text{g/ml}$) dan Tmaks (menit) pemberian dosis lazim (Intramuskular) dicapai $3,24 \pm 0,16 \mu\text{g/ml}$ dan $49,8 \pm 7,6$ menit. T1/2 α (jam) $1,93 \pm 0,95$, T1/2 β (jam) 222, MRT (jam²) 13.27 (Gummow *et al.*, 1995).

Tabel 2.2 Parameter kinetik diminazen aseturat pada domba sehat

Data Kinetik	Dosis i.v (2 mg/kg bb)			Dosis i.m (3,5 mg/kg)		
	Rerata	Simpang baku	Rentang	Rerata	Simpang baku	Rentang
Koefisien ($\mu\text{g/ml}$)						
C_1	15,01	1,97	12,46-17,17	3,04	1,09	1,91-4,09
C_2	5,83	2,05	3,55-8,18	3,15	1,09	2,11-4,44
C_z	1,39	0,55	0,65-1,99	3,03	0,41	2,68-3,62
Eksponensial (/Jam)						
χ_1	1,701	0,40	1,2663-2,22	1,693	0,18	1,480-1,8
χ_2	0,319	0,11	0,2174-0,42	0,287	0,05	0,246-0,35
χ_z	0,0757	0,01	0,0612-0,08	0,0603	0,006	0,054-0,07
Waktu paruh (Jam)						
$T_{1/2\chi_1}$	0,42	0,10	0,31-0,55	0,41	0,05	0,38-0,47
$T_{1/2\chi_2}$	2,39	0,83	1,65-3,19	2,47	0,39	1,99-2,81
$T_{1/2\chi_z}$	9,30	1,40	8,10-11,32	11,45	1,04	10,21-12,7
Vol. Distribusi (l/Kg)						
V_1	0,091	0,011	0,075-0,099	0,395	1,10	0,30-0,491
Konstanta transfer (/Jam)						
K_{12}	0,661	0,27	0,463-1,047	0,366	0,12	0,290-0,5
K_{21}	0,729	0,18	0,465-0,851	1,169	0,28	0,877-1,44
K_{13}	0,133	0,06	0,097-0,197	0,175	0,13	0,091-0,34
K_{21}	0,112	0,02	0,078-0,132	0,162	0,002	0,160-0,16

Diambil dari Aliu dan Ødegaard (1985).

Rute intramuskular dan intravena

C_1-C_3 = Intersep setiap fase, $\lambda_1-\lambda_2$ = tetapan laju, $T_{1/2\lambda}$ = waktu paruh setiap fase,

V_1 = Volume sentral, $K_{12}, K_{21}, K_{13}, K_{31}, K_{10}$ = Laju antar kompartemen

Studi perwatakan kinetik diminazen aseturat pada lima ekor sapi tertular akut dan kronis (*T. congolense*), serta sapi sehat dapat dipelajari menggunakan tiga kompartemen (Mamman *et al.*, 1993). Hasil penelitian menunjukkan pemberian dosis lazim secara intramuskular akan menghasilkan parameter kinetik bervariasi ($p < 0,01$). Kadar puncak pada kelompok fase akut tercapai lebih tinggi ($8,25 \pm 1,72 \mu\text{g/ml}$) dibanding fase kronis ($5,04 \pm 0,26 \mu\text{g/ml}$) dan pada kelompok sehat relatif paling rendah ($4,76 \pm 0,76 \mu\text{g/ml}$).

Studi kinetik diminazen aseturat pada lima ekor kambing sehat pemberian dosis lazim dalam plasma dibandingkan dalam cairan serebrospinal, menunjukkan harga kinetik lebih tinggi di plasma. Lebih lanjut perbedaan kinetik antara plasma dibanding dalam serebrospinal seperti Tabel 2.3 (Mamman, Peregrine, 1994)

Studi kinetik pada mencit sehat dan tertular juga dilakukan oleh Mamman *et al.*, (1995^a) dengan hasil terdapat variabilitas harga beberapa parameter kinetik antara mencit tertular dibanding sehat. Keadaan tersebut terjadi pula bagi umumnya kemoterapi antitripanosoma lain terutama pada tikus penderita tripanosomiasis (Lazuardi, 1997^a).

Tabel 2.3. Parameter kinetik diminazen aseturat pada plasma dan cairan serebrospinal kambing sehat

Parameter	Unit	Plasma	Cairan serebrospinal
Cmaks	µg/ml	4,31 (± 0,22)	1,04 (± 0,81)
Tmaks	Jam	0,41 (± 0,29)	2,00 (± 0,09)
AUC ^{0-48 jam}	µg.jam/ml	50,3 (± 1,07)	19,8 (± 2,71)
AUMC ^{0-48 jam}	µg.jam ² /ml	830,5 (± 5,50)	392,0 (± 76,40)
MRT	Jam	16,3 (± 1,40)	20,6 (± 1,40)
Cl	ml/menit/kg	1,16 (± 0,02)	3,07 (± 0,43)
Vdss	L/kg	1,14 (± 0,11)	3,74 (± 0,48)

Diambil dari Mamman, Peregrine (1994)

Studi kinetik ekstravaskular kambing non-kompartemental oleh Mamman *et al.*, (1996) menunjukkan harga parameter kinetik lebih tinggi bila cuplikan dilakukan melalui siring dibanding *venoject*.

Laporan penelitian oleh Paramjit *et al.*, (2002), menunjukkan bahwa parameter kinetik diminazen aseturat pada anak sapi sehat memiliki nilai lebih tinggi dibanding sapi penderita tripanosomiasis

(dosis 3,5 mg/kg berat badan intramuskular). Bila merujuk laporan Lazuardi (2000) perbedaan perolehan nilai parameter kinetik terkait pula perwatakan kuatnya afinitas ikatan obat makromolekul.

2.1.5 Farmakogenetik

Farmakogenetik adalah salahsatu bidang ilmu dalam farmakologi klinik yang mempelajari keanekaragaman pengaruh obat akibat faktor genetik. Keanekaragaman dapat terjadi pada individu dalam satu populasi terdistribusi secara kontinyu (unimodal), atau diskontinyu (bimodal / polimoda). Sedangkan pengaruh obat dapat berupa parameter farmakodinami dan farmakokinetik pada individu sehat atau sakit (Santoso, 1991).

Tinjauan variabilitas respon kinetika diminazen aseturat dalam kerabat ternak ruminansia, hingga kini masih belum pernah dikaji secara mendalam. Namun melalui analogi kasus defisiensi G6PD pada manusia uraian Thomson *et al.*, (1991), maka analisis $T_{1/2/2\beta}$ tiga kambing oleh Mamman *et al.*, (1996) bermakna memiliki dua modal. Seandainya hasil analisis paparan di atas ditambah dengan data waktu paruh eliminasi kambing hasil penelitian El Banna *et al.*, (1999) maka menjadi tiga modal. Namun bila menganalisa data waktu paruh eliminasi peneliti dari El Banna *et al.*, (1999) antara kambing dan domba memiliki kecenderungan unimodal meskipun memiliki harga beda sangat tipis ($\pm 2,36$ jam). Beda tipis tersebut sangat lazim mengingat jenis

hewan yang digunakan sebagai subyek tidak sejenis, sementara Saunders dan Trapp (1994) menyatakan perbedaan tipis pada sampel besar dapat diabaikan.

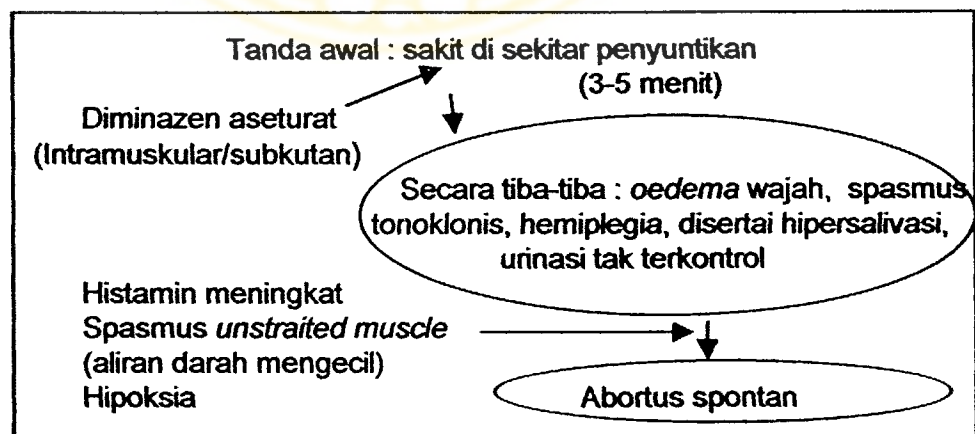
Analisis waktu paruh eliminasi diminazen aseturat pemberian 3,5 mg/kg berat badan intramuskular pada empat ekor domba hasil laporan Aliu, Ødegaard (1985), menunjukkan bentuk unimodal. Bentuk unimodal juga terdapat pada sapi perah hasil analisis data waktu paruh eliminasi laporan penelitian Mdachi *et al.*, (1995). Bentuk unimodal diminazen aseturat sering ditemui pada jenis hewan seperti domba, sapi dan kerbau. Sedangkan pada jenis kambing amat bervariasi mulai dari unimodal hingga polimodal (trimodal).

Kemoterapi antitripanosoma suramin pada subyek tertular dapat menghasilkan variabilitas hingga berpola trimodal, namun pada subyek sehat hanya berpola unimodal (Lazuardi, 1997^a; Lazuardi, Soepartono, 1999).

Secara faali setiap spesies memiliki kemampuan berbeda-beda dalam menanggapi keberadaan diminazen aseturat dalam tubuh. Anjing relatif tak tahan terhadap diminazen aseturat disusul kucing dan unta. Ketidaktahanan terhadap diminazen aseturat terkait erat dengan keberadaan ekspresi N-asetiltransferase pada setiap individu (Greene *et al.*, 1999).

2.1.6 Kontraindikasi dan reaksi lanjutan

Diminazen aseturat dalam penggunaan di lapangan dianjurkan tidak diberikan pada jenis hewan peka bunting (kuda dan unta). Perhatian penggunaan pada hewan bunting didasarkan alasan kemungkinan kemunculan resiko kematian janin akibat reaksi alergi berlebihan. Reaksi alergi dapat terjadi secara mendadak dengan diawali timbulnya *oedema* di sekitar muka serta peningkatan frekuensi nafas, selang beberapa menit kemudian hewan terjatuh disertai spasmus tonoklonis. pada kondisi demikian dapat diberikan antialergi sebagai antidotum reaksi hipersensitif. Secara khusus reaksi lanjutan dapat terjadi pada jenis hewan peka seperti kuda terutama di sekitar penyuntikkan yaitu berupa kebengkakkan (Gambar 2.4). Beberapa informasi produk menyatakan reaksi lanjutan pada kuda dapat timbul bila penyuntikkan melebihi 10 ml. Tetapi hal tersebut tak dapat dijadikan ketentuan mengingat sensitivitas setiap individu tak sama (Hoechst, 1999).



Gambar 2.4. Reaksi lanjutan diminazen aseturat dengan kontraindikasi hewan peka bunting.

2.1.7 Penentuan kadar

Penentuan kadar diminazen aseturat dalam matrik biologi termasuk dalam darah sejak pertama kali obat dipasarkan, telah banyak dilaporkan seperti tampak pada Tabel 2.4.

Tabel 2.4. Analisis diminazen aseturat dalam matrik biologi

Instrumen	Deskripsi	Hasil	Kepustakaan
Kolorimetri	Berlaku untuk senyawa diazo	Batas deteksi 0,5µg/ml	Raether <i>et al.</i> , 1972
SUV	Ekstrasi dilakukan bertahap	-	Klatt, Hajdu, 1976
KCKT	Fase terbalik, dengan pasangan ion. Baku internal 3,4 dimethoxy benzamide	Batas kuantifikasi 0,1µg/ml	Fouda, 1977 ^a
KGSM	-	Batas deteksi 0,1 µg/ml	Fouda, 1977 ^b
RIA	Label ¹⁴ C-diminazen aseturat	-	Gilbert, Newton, 1982
KCKT	Fase terbalik dengan pasangan ion. Baku internal imidocab dipropional	Harga perolehan kembali 92 ± 7,8 %, Koefisien variasi rerata 6,5 %, linearitas (r^2) > 0,998, Batas kuantifikasi 50 ng/ml	Aliu, Ødegard, 1983
KCKT	Fase terbalik dengan pasangan ion. Baku internal imidocab dipropional	Linieritas (r^2) 0,99	Aliu, Ødegard, 1985
KCKT	Fase terbalik dengan pasangan ion. Baku internal imidocab dipropional	-	Aliu <i>et al.</i> , 1993
KCKT	Fase terbalik dengan pasangan ion (1-heptan sulphonic acid sod. Salt) baku internal Imidocarb. Pemisahan dilakukan dengan pemecahan ikatan dengan metanol selanjutnya dengan SPE	Batas deteksi 0,36 µg/ml	Gummow, 1993

Dilanjutkan

Lanjutan

KCKT	Idem, tanpa dilakukan pemecahan obat-protein jadi langsung dilewatkan SPE	Harga perolehan kembali 98-95 %, Koefisien variasi 5 %, Linearitas (r^2) 0,99	Gummow <i>et al.</i> , 1994
KCKT	Fase terbalik dengan pasangan ion (1-octano sulphonic acid sod. Salt). Baku internal imidocarb dipropionat. Pemisahan tanpa harus memecah ikatan obat-protein dan langsung dilewatkan SPE	Harga perolehan kembali 96 %, Koefisien variasi ≤ 15 %, Linearitas 0,996, batas deteksi 2 ng/ml, batas kuantifikasi 10 ng/ml	Gummow <i>et al.</i> , 1995.
SUV	Panjang gelombang daerah pemeriksaan 220-230 nm.	-	Victor <i>et al.</i> , 1999
SUV	Idem Klatt dan Hajdu, 1976	-	Paramjit <i>et al.</i> , 2002

Cara terbaru menyidik kadar diminazen aseturat dalam plasma adalah menggunakan zona elektrofosis kapiler yang diterapkan oleh Rabanal *et al.*, (2000). Cara tersebut digunakan untuk memantau analit dalam serum dan urin. Preparasi sampel dari matrik biologi dilakukan menggunakan Sep-pak C18. Dalam pengerjaan tersebut terlebih dahulu dilakukan orientasi pengerjaan tentang mobilitas elektroforesis, pengaruh pH, konsentrasi dapar, tegangan listrik, temperatur. Selain itu dilakukan analisis tentang hukum Ohm untuk mendapatkan optimasi kerja. Dalam perkembangan lebih lanjut cara analisis elektroforesis kapiler tak banyak diketahui.

2.2 Tripanosomiasis Pada Hewan

Tripanosomiasis adalah suatu penyakit parasit darah pada hewan maupun manusia diakibatkan oleh suatu jenis parasit protozoa eukaryot dan membutuhkan induk semang antara untuk perkembangbiakan. Predileksi *Tripanosoma* dalam tubuh induk semang terdapat dalam aliran darah (*bloodstream*), kelenjar limfe, jaringan tubuh mamalia. Bila dikaitkan dengan perilaku hidupnya, parasit ini termasuk golongan haemoflagelata, klas Zoomastiphorea, Order Protoamastigida, Famili Tripanosomatidae.

Genus *tripanosoma* memiliki banyak spesies dan isolat serta memiliki tingkat keganasan berbeda-beda tergantung jenis hewan yang ditularinya. Sebagai contoh adalah *T. congolense* yang khas pada kambing, domba dan sapi. Demikian pula *T. melophagium* yang khas pada domba (Wilcocks dan Manson-Bahr, 1972 ; Lazuardi, 1997^b; Lazuardi, 1994).

Secara morfologi famili Tripanosomatidae memiliki lebih dari satu bentuk dalam siklus hidupnya yaitu amastigot (*leishmania*), promastigot (*leptomonas*), epimastigot (*kritidia*) dan bentuk tripomastigot merupakan bentuk dewasa.

Perkembangbiakan parasit dapat dibagi menjadi dua fase yaitu melalui siklus hidup induk semang antara (*cyclical*) dan tanpa siklus hidup induk semang antara (*non-cyclical*). Kelompok melalui siklus hidup induk semang antara (*cyclical*) masih terbagi menjadi dua jenis kelompok yaitu *salivaria* dan *stercoraria*.

Kelompok lain adalah kombinasi dari keduanya yaitu mampu berkembang biak baik dengan jalan salivaria maupun stercoraria. Contoh dalam hal ini adalah *T. melophagium* patogen pada domba yang dapat ditularkan melalui *Tabanus* spesies dan caplak domba.

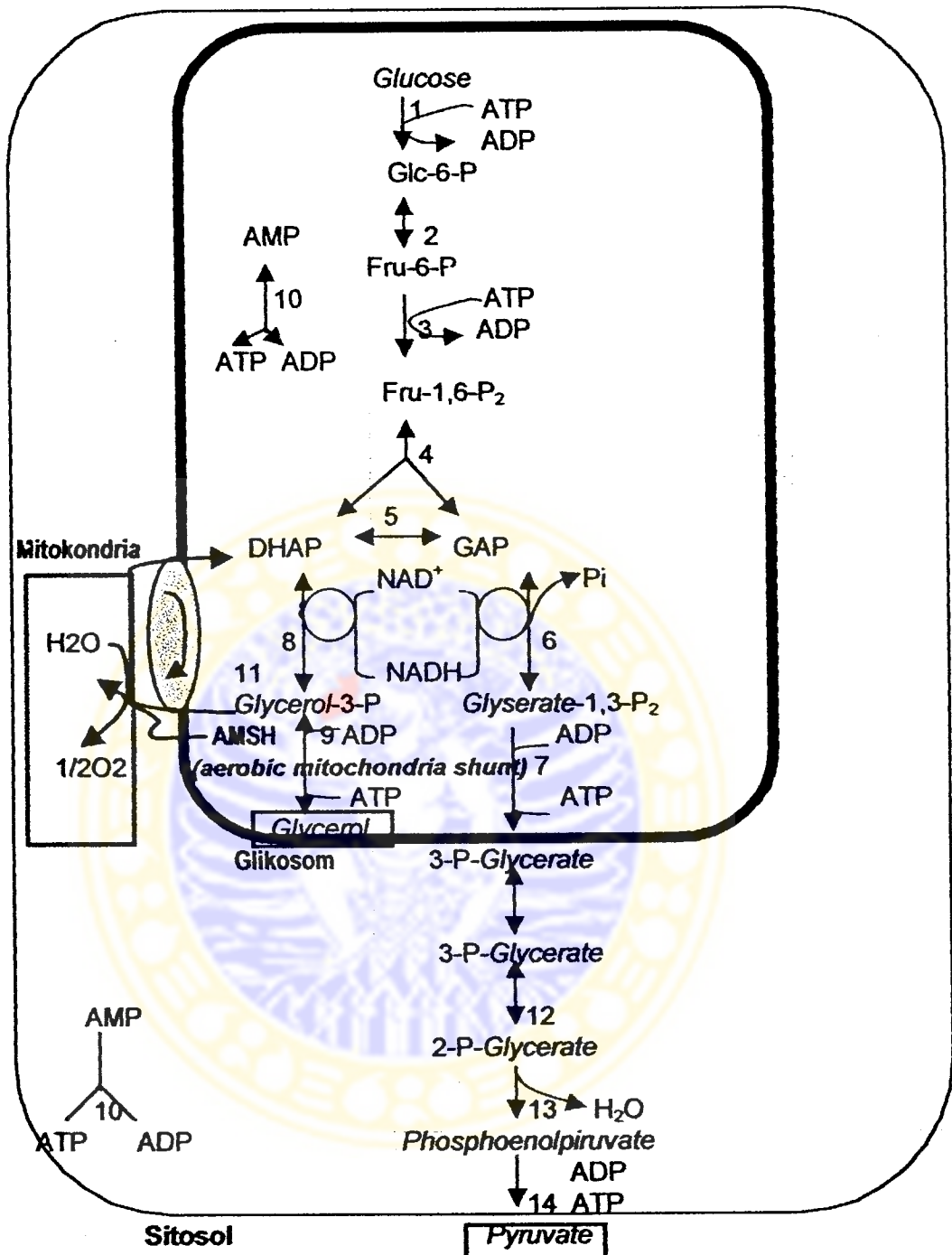
Kelompok tanpa melalui siklus induk semang antara (*non-cyclical*) pada dasarnya dapat terjadi pada semua jenis parasit *Tripanosoma*. Namun yang sering terjadi adalah bentuk *bloodstream* yang berkembang biak melalui kontak langsung antar induk semang (Urquhart *et al.*, 1994).

2.2.1 Biokimia

Tripanosoma dikenal dengan parasit protozoa aerob dengan ciri memiliki bulu cambuk (*flagellates*) sehingga digolongkan kinetoplastida (*Leishmania* dan *Tripanosoma*). Kelompok kinetoplastida memiliki mitokondria mengandung kinetoplas asam deoksiribonukleat (kDNA) terdiri dua bagian rantai panjang protein penting yaitu beberapa puluh maksisirkel (20-40 kb) dan ribuan minisirkel (0,5-2,5 kb). Rantai panjang protein maksisirkel bertanggungjawab melakukan encode ribosomal asam ribonukleat-*soluble* (RNAs) dan beberapa protein yang dibutuhkan untuk aktivitas bioenergetik mitokondria. Sedangkan minisirkel berfungsi menyempurnakan aktivitas transkripsi termasuk penyempurnaan pembentukan rantai panjang asam ribonukleat (RNA) dan duplikasi pembentukan asam deoksiribonukleat.

Dalam melakukan respirasi *Tripanosoma* memiliki dua aktivitas isoenzim yaitu di dalam Glikosom dan Sitosol. Aktivitas isoenzim di dalam Glikosom banyak terkait dengan proses glikolisis (Gambar 2.5) termasuk proses *pentose-phosphate pathway*. Aktivitas di kompartemen sitosol hingga saat ini masih kontroversi namun diduga terkait tak langsung dengan pengeluaran hasil akhir aktivitas di Glikosom. Masalah respirasi *Tripanosoma* masih terus diteliti dan diketahui melibatkan banyak enzim (Tabel 2.5). Clarkson *et al.*, (1989), Opperdoes dan Michels (2001) menyatakan kunci utama adalah gliserofosfat oksidase dan aktivitas glikolisis pada Glikosom dan Sitosol.

Pentose-phosphate pathway (PPP) adalah suatu cara lain metabolisme glukosa oleh kerabat *Tripanosoma* di luar cara glikolisis. PPP lebih dikenal dengan nama *Hexose monophosphate shunt*. Perbedaan antara aktivitas glikolisis dengan PPP adalah pemanfaatan sumber energi melalui pemecahan fosfat yang berbeda (glikolisis bersumber pada ATP sedangkan PPP bersumber pada NADPH). Pada PPP terjadi konversi G6P menjadi *ribose 5-phosphate* (R5P) sehingga memperlancar biosintesis nukleotida. Pada oksidasi di PPP terjadi perubahan G6P menjadi *ribulose 5-phosphat* (Ru5P) yang membutuhkan 2 mole NADPH dan dilanjutkan proses non-oksidasi.



Gambar 2.5. Glikolisis pada *Trpanosoma dewasa*, kotak metabolit glikosom dan sitosol adalah nutrisi atau produk akhir metabolisme,

Macam enzim : 1. Hexokinase, 2. Phosphoglucose isomerase, 3. Phosphofruktose, 4. Aldolase, 5. Triose phosphate isomerase, 6. Glyceraldehide-3-phosphate dehydrogenase, 7. Phosphoglycerate kinase, 8. Glycerol 3-phosphate dehydrogenase, 9. Glycerol kinase, 10. Adenylate kinase, 11. Glycerol 3-phosphate oxydase, 12. Phosphoglycerate mutase, 13. Enolase, 14. Piruvate kinase (Sumber Oppendoes, Michels, 2001).

Tabel 2. 5 Enzim keperluan metabolisme *Tripanosoma*

Enzim	Diskripsi
<i>Hexokinase</i>	Merupakan enzim pertama pada jalur glikolisis dalam glikosom. <i>Tripomastigot</i> mengandung 36 % dibanding sel eukaryot lain. Dikeluarkan melalui peptida pada N-terminal <i>peroxisomal import signal</i> (PTS2). Berpengaruh langsung pada metabolisme <i>Glucose 6 phosphat</i> (G6P) melalui <i>glucose 1,6 biphosphate</i>
<i>Glucose 6 phosphate isomerase</i> (GPI)	Sebagai katalis dan bufer dalam aktivitasnya di glikosom. Sebagai pencegah reaksi berlebihan glikolisis. Bila terjadi penghambatan GPI terjadi pengurangan aktivitas glikolisis.
<i>Phosphofru ctokinase</i> (PFK)	Merupakan enzim aktif yang bekerja setelah berhubungan <i>Pirophosphate Inorganic</i> (Ppi) – <i>dependent Ppi</i> . Menjaga kelangsungan kinerja Glikolisis.
<i>Aldolase</i>	Suatu katalisis <i>reversible cleavage</i> pada <i>Fructose -1,6 – biphosphate</i> melalui formasi <i>Schiff</i> didasarkan triose <i>Dihydroxyaceton phosphate</i> (DHAP) dan <i>Glyceraldehyde 3 phosphate</i> (GA3P) tanpa ion logam divalen. Enzim ini cepat terpantau pada kerabat <i>Tripanosoma</i> dewasa dan berfungsi mengendalikan aktivitas glikolisis berlebihan.
<i>Triose Phosphate Isomerase</i> (TIM)	Merupakan enzim katalisis identik dengan <i>Aldolase</i> , namun jumlahnya sangat sedikit (< 0,04% dari total protein parasit) dan banyak ditemukan di glikosom. Disinyalir menjadi menjadi target aksi kemoterapi <i>Suramin</i> [®] terutama di bagian homodimeri.
<i>Glyceraldeh yde 3 phosphate dehydrogen ase</i> (GAPDH)	Dikenal isoenzim penting di kompartemen glikosom, dan mudah di hambat oleh unsur epoksi yang terikat GAPDH inhibitor (<i>Pentalenolacton</i> , <i>Gossypol</i> , <i>Agaricic acid</i>). Ikatan dengan substrat spesifik mampu di hambat oleh sintesis poksi, alfa enon/analog substrat selektif melalui obat kompetitif. Jumlah enzim GAPDH cukup menonjol pada kerabat <i>T. brucei</i> , <i>T. cruzi</i> dan <i>Leishmania mexicana</i> .
<i>Glycerol 3 phosphate dehydrogen ase</i> (G3PDH)	Salahsatu enzim katalisis penting yang keberadaannya antara 23-25 dari seluruh protein parasit. Khusus protozoa prokaryotik enzim ini jauh lebih besar (32-36 %) dibanding <i>tripomastigot</i> dan dikenal khas protozoa prokaryotik. Bekerja diantara bagian glikosom dan mitokondria, oleh sebab itu terdapat unsur yang bakal dikirim ke mitokondria.
<i>Glycerol Kinase</i> (GK)	Termasuk enzim glikolisis utama dengan kemampuan kerja cukup tinggi dibanding <i>Glycerol 3 phosphat</i> (G3P). Mampu memicu mutasi bila aktivitas berlebihan.
<i>Phosphogly cerat kinase</i> (PGK)	Merupakan enzim glikolisis yang dapat ditemukan dalam kompartemen glikosom maupun kompartemen sitosol. Aktivitas kerja enzim PGK secara absolut membutuhkan (ATP). Secara laborator PGK diperkirakan diekspresikan di bagian C-terminal rantai asam deoksiribonukleat.

Dilanjutkan

Lanjutan

<i>Phosphoglyceral mutase (PGM)</i>	PGM dan EN banyak ditemukan dalam kompartemen sitosol. Tak banyak dieksplorasi oleh para peneliti. Kurang spesifik untuk kerabat <i>Tripanosoma</i> (banyak ditemukan pada sel termasuk sel tanaman).
<i>Enolase (EN)</i>	
<i>Pyruvat kinase (PK)</i>	Dikenal enzim glikolisis yang ditemukan di sitosol. Merupakan hasil akhir produk glikolisis. Bekerja melalui banyak gula fosfat seperti <i>Fru(2,6) -P₂</i> , <i>Fru(1,6) -P₂</i> , <i>Glucose (1,6)P₂</i> , <i>Ribulcse biphosphate</i> . Membutuhkabr ko-faktor nukleotida adenin dan fosfat inorganik dalam kerja fisiologi dan membutuhkan ATP untuk pembuatan PK.

Proses non-oksidasi pada PPP melibatkan enzim seperti transketolase dan transaldolase dimana akan menghasilkan 2-3 unit karbon yang bakal dimanfaatkan pada proses fosforilasi karbohidrat. Hasil akhir proses non-oksidasi adalah *glycolytic intermediate fructose 6-phosphate (F6P)* dan *Glyceraldehyde 3-phosphate (GA3P)* dan keduanya akan dimanfaatkan pada proses fosforilasi gula lebih lanjut. Pada parasit bentuk *Tripomastigote* kerabat *T. brucei*, dua enzim saat proses oksidasi dapat mudah. Sedangkan dua enzim lain pada proses non-oksidasi tak mudah ditemukan (Ru-5P epimerase dan Transketolase).

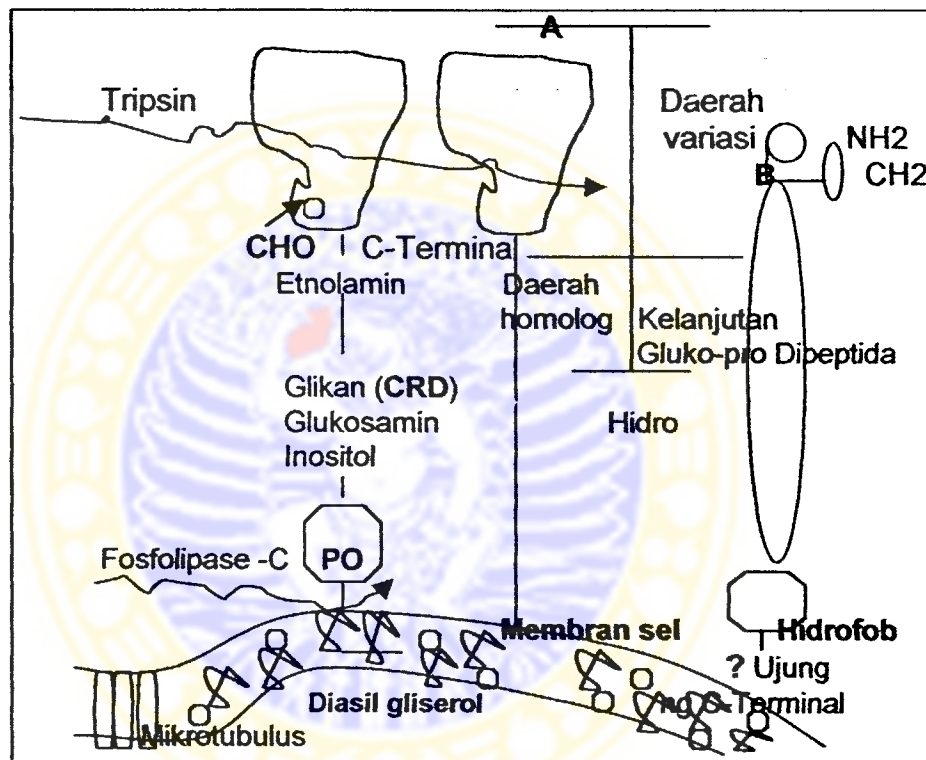
2.2.2 Antigenic variation surface (AVS)

Komposisi permukaan *Tripanosoma* terbagi menjadi dua bagian (membran plasma dan suatu lapisan yang membentuk mikrotubulus subpelikular). Hubungan membran plasma dengan lapisan mikrotubulus (mengandung mikrofilamen), secara fisik

sangat erat (De Souza, 2002). Cross (2001), menyatakan membran plasma, didominasi *Glycosylphosphatidylinositol* (GPI). De Souza. (2002) menyatakan bahwa protein permukaan merupakan suatu jumlah protein besar dan gabungan ikatan GPI dan *15-carbon famesyl* atau *20-carbon geranyl* pada *C-terminal cystein residues* (*protein prenylation*). Mikrotubulus subpelikular terletak di bawah membran plasma yang membentuk mikrotubulus subpelikular dan berhubungan langsung dengan membran plasma melalui filamen kecil. Unsur tersebut menjadikan hubungan membran plasma dengan mikrotubulus subpelikular terkait langsung dengan tingkat kerapuhan sel serta tidak mudah dilakukan pemisahan antar keduanya. Bila mencotoh *T. cruzi* bagian mikrotubulus subpelikular diketahui saling berjajar dengan jarak antara satu dengan lainnya 44 nm dan dipisahkan antara satu dengan lainnya oleh ruang kosong. Jumlah mikrotubulus dalam sel parasit terkait langsung dengan besarnya diameter sel. Bagian posterior dan anterior parasit tak banyak ditemukan mikrotubulus dibanding antara inti sel dan kinetoplas sekitar golgi kompleks (jumlah mikrotubulus terbesar).

Diameter mikrotubulus dihitung pada bagian tengah sekitar 20 nm, sedangkan dinding mikrotubulus memiliki ketebalan sekitar 5 nm yang mengandung 13 protofilamen. Peranan dari seluruh jumlah mikrotubulus yang ada baru diketahui enam tubulus diantaranya alfa dan beta sebagai konstituen subunit mikrotubulus.

Gama berperan kecil sebagai pengendali pembelahan mikrotubulus demikian pula halnya bagi delta, epsilon dan zeta. Tubulus parasit diperkirakan bagian yang berpengaruh penimbul fenomena AV bagi setiap individu parasit. Sketsa protein permukaan dapat diikuti seperti tampak pada Gambar 2.6.



Gambar 2.6 Sketsa tempat variant antigenik permukaan
 Dalam sketsa *procyclin* dan varian khas glikoprotein (merupakan varian antigenik permukaan), memperlihatkan hubungan dengan sel membran. Saat masa pasca parasit matang terhisap lalat maka akan dilakukan sintesis protein permukaan (*procyclin*). Struktur (A) varian glikoprotein permukaan (B) struktur *procyclin*. Terdapat bagian peka terhadap Tripsin dan Fosfolipase C. Aneka komponen seperti PO = fosfat grup, CHO = bagian karbohidrat, CRD = *cross reacting determinant*. Secara serologis terdapat kesamaan glikan pada varian glikoprotein. Pengikatan alamiah *procyclin* ke membran belum diketahui (?).
 (Sumber dari Seed dan Hall, 1992).

2.2.3 Patogenesis

Kasus tripanosomiasis pada hewan bersifat spesies spesifik sehingga berpotensi memiliki kemampuan memunculkan empat tingkat keganasan yaitu subakut, akut, kronis dan karier (Lazuardi, 1994). Tingkat keganasan subakut oleh Urquhart *et al.*, (1994) diartikan hiperakut yaitu dalam waktu singkat berimplikasi fatal akibat cepatnya perkembangan parasitemia.

Tingkat keganasan parasit *Tripanosoma* pada subyek induk semang sangat variatif, sehingga Lazuardi (1994) dan Soehami *et al.*, (2002) menetapkan empat faktor penyebab timbulnya variasi keganasan. Faktor-faktor yang dimaksud adalah (1) kesesuaian jenis parasit berkaitan dengan macam induk semang, (2) kepekaan individu induk semang, (3) menurunnya sifat keganasan parasit. Faktor lain adalah (4) kemungkinan timbulnya imunitas spesifik dalam tubuh induk semang sehingga mampu menetralsir invasi antigenitas parasit.

Pengaruh faktor kepekaan induk semang dikaitkan variasi antigenitas dapat merujuk kasus infeksi *T. evansi* pada tikus dibanding kelinci. Pada tikus pencapaian puncak parasitemia hanya berlangsung 3-4 hari disusul kematian, namun pada kelinci pencapaian puncak parasitemia tak pernah terjadi sehingga mampu bertahan hidup antara 3-6 bulan, disusul kematian. Seed (2001) menyatakan fenomena itu akibat adanya sistem pertahanan natural tubuh oleh sebagian induk semang seperti *human*

trypanolytic factor pada serum manusia atau *buffalo xanthine oxidase* pada tubuh kerbau.

Sifat keganasan parasit berpengaruh terhadap perkembangan parasitemia dalam tubuh induk semang. Hal tersebut dapat terjadi saat dilakukan pemisahan antara *Tripanosoma* dengan sel darah merah melalui *Diethyl Cellulose* (DE52) berdasarkan berat molekul (BAKITWAN, 1983). Penurunan antigenitas diperkirakan akibat mekanisasi abrasi DE52 (pertukaran ion) pada sebagian protein permukaan yang mengakibatkan timbulnya perubahan antigenitas.

Tinjauan gejala penderita tripanosomiasis pasca inkubasi amat bervariasi dan terkait erat dengan tingkat keganasan parasit (subakut, akut, kronis dan karier). Namun secara umum memiliki gejala demam intermiten, anemia, *oedema*, *splenomegaly*, *polyadenitis*, *paraesis* bagian bahu, kelainan mata, emasi, *cachexia* disusul kematian.

Gejala penderita dengan tingkat keganasan subakut sering ditemui di lingkungan laboratorium terhadap induk semang pilihan dengan masa inkubasi tak lebih beberapa hari. Pada mencit dan tikus akibat infeksi *T.evansi* isolat Bangkalan hanya mampu bertahan tak lebih dari 3 hari, dengan menampakkan gejala bulu berdiri, anemi, lemah (Lazuardi, 1997^c). Kondisi subakut yang dialami induk semang diakibatkan adanya multiplikasi Tripomastigot (*blood stream parasites*) berlebihan sehingga pada saat tertentu jumlah parasit akan mengakibatkan kematian.

Gejala penderita tripanosomiasis pada tingkat keganasan akut banyak diderita oleh induk semang spesifik akibat penularan alami dengan melibatkan induk semang antara. Kejadian pada penularan akut dapat berlangsung antara 7 hari hingga beberapa minggu hingga akhirnya timbul keadaan fatal (*infousta*) dan diakhiri kematian (Lazuardi, 1994). Gejala patognomonik pada kasus akut dapat ditemui pembesaran kelenjar getah bening, anemi dan degenerasi sel disertai infiltrasi sel radang (Urquhart *et al.*, 1994).

Jenis ruminan sangat peka terhadap infeksi *T. congolense*, sehingga bersifat akut dan akan memunculkan gejala 2-3 minggu pasca tertular. Tanda awal akan ditemui peningkatan suhu ($> 40^{\circ}\text{C}$), penurunan berat badan sedikit demi sedikit, *prostration* (kepala menunduk), emasi. Dengan berjalannya waktu akan ditemui keadaan *cachexia*, anemia, adenitis *praescapula*, lakrimisasi, *ptechie conjunctiva*, *kerato-conjunctivitis* (The manual of tropical veterinary parasitology, 1990).

Kasus kronis tripanosomiasis umumnya terjadi pada model penularan alami terhadap induk semang non-spesifik dengan melibatkan induk semang antara. Radostits *et al.*, (2000) mencontohkan kasus infeksi *T. congolense* pada semua jenis hewan dimana penularan terhadap hewan spesifik berakibat akut dan terhadap hewan non-spesifik bersifat kronis dengan gejala anemi dan emasi.

Kasus karier banyak terjadi pada hewan tergolong liar dan umumnya bertindak sebagai *reservoir* yang suatu saat mampu menimbulkan wabah di daerah tersebut. Tidak jarang ternak peliharaan mampu mengalami penularan karier dengan tanda khas terjadi penurunan berat, tak mempengaruhi aktivitas fisik. Kondisi tersebut dikenal dengan kasus Tripanotoleran dan sebagai contoh adalah sapi peranakan *N'dama* (*Bos taurus*) di Afrika Barat (Kennedy, 1975; Urquhart *et al.*, 1994).

2.2.4 Kultivikasi *in vitro*

Upaya penemuan media kultivikasi *in vitro* yang pernah dilakukan sejak tahun 1904, secara umum terbagi menjadi tiga jenis media yaitu cair, agar darah dan mengandung kultur sel fibroblast (Tanuri *et al.*, 1985; Soulsby, 1986; Buckner *et al.*, 1996; Gobert *et al.*, 1998). Diantara tiga media yang pernah dilakukan, media cair lebih banyak dikembangkan mengingat mampu menghasilkan isolat dengan kemurnian tinggi (Soulsby, 1986; D'Alessandro-bacigalupo dan Saravia, 1992; Sumartono, 1995).. Dalam Tabel 2.6 dapat diikuti perkembangan aneka media pertumbuhan yang pernah dilakukan pada kajian *in vitro*.

Tabel 2.6 Media pertumbuhan *in vitro* untuk *Trypanosoma* spesies

Eukaryot	Media pertumbuhan	Kepustakaan & diskripsi
<i>T. rangeli</i>	<i>Liver Infusion Tryptose</i> (LIT) mengandung 15-20 % <i>whole blood</i> manusia atau kelinci dan <i>Foetal Bovine Serum</i> (FBS) 10 %.	D'Alessandro-bacigalupo dan Saravia, 1992
<i>T. cruzi</i> <i>T. rangeli</i>	Warren	D'Alessandro-bacigalupo dan Saravia, 1992
<i>T. brucei</i>	HEPES – bufer RPMI 1640 mengandung FBS 20 % (in aktif)	Soulsby, 1986
<i>T. evansi</i> isolat <i>DI Yogyakarta</i>	HEPES – bufer RPMI 1640 + 1 % Glukose + 7,5 % NaHCO ₃ + antibiotik dan mikostatin	Sumartono, 1995
<i>T.b.brucei</i>	Iscove + 0,1 mM hipoksantin, 0,075 mM adenosin, 2 mM Piruvat, 2 mM l- glutamin, 50 µg/ml gentamisin, 0,2 mM 2 – merkaptoetanol + 12 % FBS (in aktif)	Kaminsky, Zweygarth, 1989
<i>T.b.brucei</i>	Dulbeko Modifikasi Eagke Media (MEM) + <i>Bovine Serum Albumin</i> (BSA) 4 mg/ml + superoksid dismutase 100 IU/ml, katalase 100 IU/ml, melatonin 1-10 µg/ml dan nitro-l-arginin 1 mM.	Gobert <i>et al.</i> , 1998
<i>T.b.brucei</i>	Dulbeko Modifikasi Eagke Media (MEM) + <i>Bovine Serum Albumin</i> (BSA) 4 mg/ml + superoksid dismutase 100 IU/ml, katalase 100 IU/ml, melatonin 1-10 µg/ml dan nitro-l-arginin 1 mM+ makrofage	Gobert <i>et al.</i> , 1998
Sel kanker & Kinetoplastidae)	Dulbeko Modifikasi Eagke Media (MEM) + <i>Bovine Serum Albumin</i> (BSA) 4 mg/ml + superoksid dismutase 100 IU/ml, katalase 100 IU/ml, melatonin 1-10 µg/ml dan nitro-l-arginin 1 mM	Cocok untuk sel eukaryot dengan ciri aktivitas metabolisme tinggi
Mieloma	Dulbeko Modifikasi Eagke Media (MEM) + <i>Bovine Serum Albumin</i> (BSA) 4 mg/ml + superoksid dismutase 100 IU/ml, katalase 100 IU/ml, melatonin 1-10 µg/ml dan nitro-l-arginin 1 mM	Nuraini, Lazuardi, 1997
<i>T.b.brucei</i>	Iscove modifikasi Dulbeko + berbagai suplemen + 20 % kijang (in aktif)	Brun <i>et al.</i> , 1996

Dilanjutkan

Lanjutan

<i>T.b.rhodensien, T.b.brucei, T.b.brucei, T.evansi, T.equiperdum</i>	MEM + garam Earle Media mengandung 1mg glukose, 1 % MEM non-esensial asam amino (100x), 2,2 mg NaHCO ₃ , 10 mM HEPES + 2 mM sodium piruvat, 0,2 M 2-Merkaptoetanol, 0,1 mM Hipoksantin, 15 % serum kuda (in aktif)	Kaminsky, Brun, 1998
<i>T.b.gambiense</i>	MEM, + garam Earle Media mengandung 1mg glukose, 1 % MEM non-esensial asam amino (100x), 2,2 mg NaHCO ₃ , 10 mM HEPES + 2 mM sodium piruvat, 0,2 M 2-Merkaptoetanol, 0,1 mM Hipoksantin, 10 % serum manusia (in aktif) + 5 % FBS (in aktif)	Kaminsky, Brun, 1998
<i>T.congolense</i>	Iscove + 0,05 mM asam bathocuproinedisulfonik, 1,5 mM l-cystein, 0,5 mM hipoksanti, 2 mM l-glutamin, 0,12 mM 2 – merkaptoetanol, 2 mM sod piruvat, 15 % serum kambing (in aktif)	Kaminsky, Brun, 1998

Roostantia *et al.*, (2003) menggunakan media pertumbuhan *T. evansi* isolat Bangkalan dengan mencontohkan media hasil pengerjaan Brun *et al.*, (1996) dan Kaminsky, Brun (1998). Dalam penambahan suplemen glukose pada media tersebut Roostantia *et al.*, (2003) mencontohkan penambahan tersebut seperti media Dulbeko hasil pengerjaan Nuraini dan Lazuardi (1997). Media tersebut adalah MEM ditambah suplemen garam Earle mengandung 25 mM HEPES serta 1 g/l glukose, 10 mM/ MEM non-esensial asam amino (100x). Suplemen lain adalah 0,2 mM 2-merkaptoetanol, 2 mM sodium-piruvat, 0,1 mM hipoksantin, 0,05 mM asam bathocuproinedisulphonic, 15 % FBS (in aktif).

2.2.5 Diagnostik

Metode diagnosis kasus tripanosomiasis pada hewan berkembang amat cepat seiring dengan berjalannya waktu sejak mulai tahun 70-an. Upaya penegakan diagnosis terhadap kasus infeksi tripanosomiasis pada dasarnya mengarah ditemukannya parasit. Sebagai bahan pertimbangan memperkuat keputusan diagnosis adalah ditemukannya seropositif hubungan titer antigen-antibodi. Dalam Tabel 2.7^(a,b) dapat diikuti macam teknik diagnosis berdasarkan penemuan parasit maupun penemuan antigen/imun yang sering dilakukan. Pemeriksaan baku *Tripanosoma* berdasarkan temuan parasit terpercaya adalah uji biologis melalui hewan laboratorium peka tripanosomiasis. Pemanfaatan uji biologis hingga saat ini selalu diikutsertakan melalui hewan jenis mencit dan tikus. Kepekaan uji biologis cukup tinggi bahkan Enyaru *et al.*, (1998) menyetarakan dengan uji seroparasitologi *Polymerase Chain Reaction* (PCR).

Tabel 2.7^a Teknik diagnostik menemukan parasit *Tripanosoma*

Menemukan parasit	Diskripsi	Keunggulan	Kelemahan	Pustaka
Ulas darah tebal (Tanpa, dengan pewarna)	Aliran darah sentral & perifer. Sesegera mungkin. Dapat diwarnai <i>Acridine Orange</i> (AO)	Terpercaya. Cepat diketahui hasil. Praktis. Ekonomis.	Pada + sulit ditemukan. Darah segar tak dapat disimpan.	Lazuardi, 1997 ^b

Dilanjutkan

Lanjutan

Ulas darah tipis (Dengan pewarnaan)	Airan darah sentral & perifer Dengan pewarnaan <i>May-Günwald-Giemsa</i> , <i>Stevenel blue</i> , <i>Diluted Giemsa</i> , <i>Methylen blue</i> .	Terpercaya. Dapat disimpan beberapa tahun	Tak praktis. Butuh larutan pewarna. Butuh pengalaman melihat. Hasil tak dapat sesegera diketahui	<i>The manual of tropical veterinary parasitology</i> , 1990
Mikrohematokrit (Satu tahap, dua tahap)	Aliran darah sentral & perifer Parasit di <i>buffy coat</i> Darah cukup 10 µl Satu tahap : Sentrifugasi 13000-15000 g (5') Dua tahap : Sentrifugasi 6-8 ml darah 850 g (10') Sentrifugasi 12000-15000 g (1') Hematokrit ditegakkan agar mengendap (15') Dibuat natif	Pengerjaan lebih cepat dibandingkan ulas darah tipis Dapat diketahui sesegera mungkin Kemungkinan menemukan parasit lebih tinggi Sensivitas setara ulas darah tebal	Tak praktis Butuh pengalaman. Sukar dilakukan dilapangan kecuali ada aliran listrik	Prastyawati, 1989. Enyaru <i>et al.</i> , 1998 Cattard <i>et al.</i> , 1988 Rukmana, 1979
<i>Computer Assisted Tomography (CAT)</i>	Teknik pemotretan Pembacaan didasarkan perbedaan densitas Cocok untuk manusia	Dapat mencapai seluruh organ (termasuk serebrum)	Memerlukan diagnosa awal Tak ekonomis	Medina <i>et al.</i> , 1986
Imuno histokimia	Jaringan/organ secara histopatologi diiris difiksasi (formalin) diwarnai Haematoksilin eosin (HE)	Menemukan parasit di jaringan/organ	Tak praktis	Sudarto <i>et al.</i> , 1990

Ditinjau dari waktu pantau uji biologis, menunjukkan membutuhkan waktu bervariasi, namun mengacu temuan Odika *et al.*, (1995), dapat dilakukan 15-60 hari pasca pengobatan. Waktu tersebut didasari alasan kemungkinan kemunculan ulang parasit pasca pengobatan (\pm 10-12 hari). Dalam praktek laboratorium,

Lanjutan

<i>Enzym Link Immunosorbent assay (ELISA)</i>	<i>Sandwich method</i> : Ikatan fase padat anti-goat IgG + serum antitripanosoma IgG, selanjutnya + Antigen + <i>Hoseperoksidase</i> label anti-Tripanosoma konjugat + substrat. Dilakukan pembacaan berdasarkan opak densitas	Secara teoritis Sensitivitas 97,2 %. Di Vietnam Sensitivitas 63 %. Spesifisitas 75 %. Di Indonesia Sensitivitas 71-88 %. Spesifisitas 55-75 %. (Pada nilai ambang kepositifan 20 % kepercayaan 95 %).	Sering memunculkan pembacaan positif palsu	<i>World Health Organization</i> , 1976. Davison <i>et al.</i> , 1996 Le <i>et al.</i> , 1998
<i>Polymerase Chain Reaction (PCR)</i>	Deteksi keberadaan DNA Terdiri dari enzim termostabil DNA polimerase Primer spesifik oligonukleotida (konduktor). Fraksinasi berat molekul secara gel elektroforesis	Sensitivitas tinggi	Tak mudah memperoleh primer spesifik Membutuhkan perangkat lebih dari satu macam	Moser <i>et al.</i> , 1989 Kanmogne <i>et al.</i> , 1996 Stothard <i>et al.</i> , 1997 Clausen <i>et al.</i> , 1999

Tinjauan mengenai sensitivitas dan spesifisitas CATT bila dibandingkan dengan ELISA, menunjukkan beberapa hal terdapat keunggulan terutama mengenai spesifisitas (± 100 %) sedangkan tingkat sensitivitas sedikit di bawah ELISA ± 78 % (Davison *et al.*, 1996). Spesifisitas CATT disebabkan antigen yang digunakan adalah *common surface antigen* sehingga mampu menimbulkan tingkat aglutiniasi tinggi saat sampel memunculkan antiTripanosoma kendati dengan titer antibodi rendah. Kelemahan metode CATT

adalah harus dikerjakan dalam suasana aseptik dan suhu 25-28 °C serta dibaca dengan teknik pembacaan sesegera dan secermat mungkin. Sedangkan kelebihan CATT adalah menghasilkan interpretasi linier dengan diagnosis uji biologis sehingga menghilangkan hasil positif palsu.

2.3 Regimen Dosis Pemberian Berulang

Dalam aplikasi klinik diketahui banyak ragam regimen dosis suatu obat yang diberikan pada penderita baik pemberian tunggal maupun berulang. Pemberian regimen dosis tersebut amat dipengaruhi beberapa faktor diantaranya adalah bentuk sediaan dan rute pemberian (Martinez, 1998).

Regimen dosis pemberian tunggal umumnya digunakan pada sediaan biologik seperti vaksin dan sera. Sedangkan regimen dosis pemberian berulang banyak ditemukan pada obat-obat golongan farmasetik.

Pemberian obat berulang dilakukan dengan tujuan untuk mendapatkan kadar obat mencapai tingkat dan rentang terapi tertentu, dengan demikian strategi pengobatan mampu menghasilkan khasiat sesuai rencana. Tujuan tersebut disyaratkan fraksi obat bebas pasca fase absorpsi mencapai kecukupan kadar sehingga mampu mencapai target aksi. Pada keadaan demikian kemampuan pengikatan obat-makromolekul pada masa absorpsi dan distribusi

lalu dimulai sejak waktu ulangan diberikan. Hasil penjumlahan setiap saat antara kadar lama dengan kadar baru merupakan kadar kumulatif superposisi. Konsep superposisi cara cepat untuk memastikan diperolehnya kecukupan kadar terapi pada penderita klinik, mengingat penderita klinik sering menampakkan penyimpangan. Pope, Baggot (1983) memaparkan pada kasus klinik penyimpangan kadar banyak dipengaruhi oleh kondisi patofisiologi penderita.

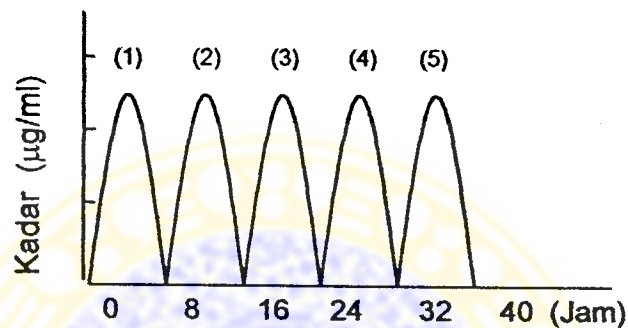
2.3.2 Macam strategi pemberian dosis berulang

Hingga saat ini diketahui terdapat beberapa cara pemberian berulang seperti tampak pada Tabel 2.9.

Tabel 2.9 Macam pemberian obat berulang

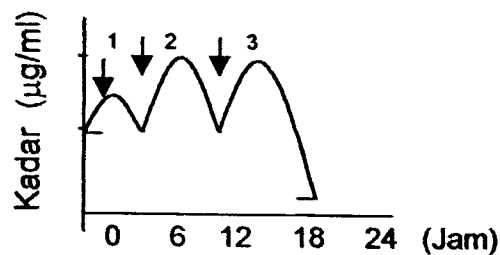
Cara	Penerapan
I	Pemberian berulang dengan dosis lazim dan interval waktu tetap setelah masa eliminasi pemberian sebelumnya berlangsung.
II	Pemberian diawali dosis lazim, pengulangan dengan dosis pemeliharaan interval waktu tetap (dosis pemeliharaan > dosis lazim)
III	Pemberian diawali dosis lazim selanjutnya dilakukan pengulangan dengan interval waktu semakin pendek disertai peningkatan dosis
IV	Pemberian awal dosis muatan, ulangan dengan dosis pemeliharaan interval waktu tetap (dosis pemeliharaan < dosis muatan).
V	Pemberian diawali dosis permulaan, ulangan dengan berbagai dosis (dosis lazim, dosis pemeliharaan, dosis muatan pada interval waktu tak tetap)
VI	Pemberian awal dosis lazim, ulangan dosis terapi tertentu dengan interval waktu tetap hingga menghasikan kadar <i>steady state</i> (Css). Cara ke enam merupakan upaya memperoleh kadar tinggi melalui pengaturan interval (τ) dan banyaknya ulangan (n).

Pemberian cara I sering digunakan untuk perawatan klinik jangka lama seperti kasus insufisiensi ginjal. Penggunaan pengobatan strategi cara I ditujukan untuk obat-obat *nephrotoxic* dengan $T_{1/2}$ eliminasi lama, sehingga pemberian dosis berulang cara pertama (Gambar 2.7a) mengurangi beban kerja ginjal.



Gambar 2.7a. Pemberian dosis berulang ^{1,2,3,4,5} penderita insufisiensi ginjal (Diambil dari analogi Gambar 2 oleh Fabre, Balant, 1983)

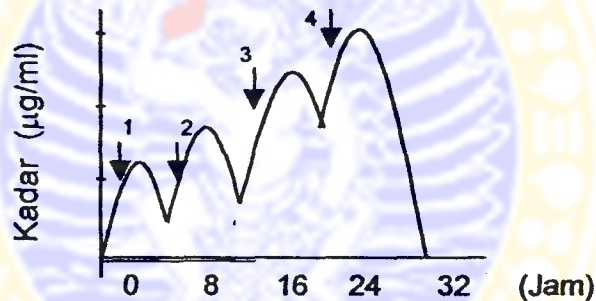
Pemberian cara II dimulai dengan dosis awal (*initial dose*) dilanjutkan dosis pemeliharaan pada interval waktu tetap. Cara II sering digunakan untuk tujuan tindakan klinik pencapaian jangka waktu pengobatan tertentu dengan dosis pemeliharaan lebih besar dari dosis awal (Gambar 2.7b).



Gambar 2.7b. Pemberian diawali dosis awal⁽¹⁾ selanjutnya dilakukan pengulangan interval tertentu dengan dosis pemeliharaan ⁽²⁾₍₃₎.

Pemanfaatan cara II banyak dilakukan dengan maksud memperlama masa kerja tanpa merancang ulang dosis pemberian seperti penggunaan mebendazole untuk *echinococcosis* (Edwards, Breckenridge, 1988).

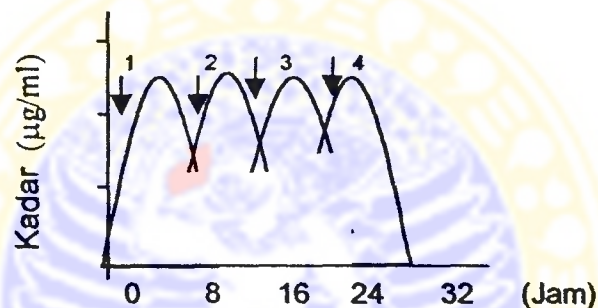
Strategi cara III diawali dosis lazim selanjutnya dilakukan pengulangan pemberian dengan meningkatkan dosis setiap kali pemberian dilakukan serta memperpendek interval waktu pemberian (Gambar 2.7c). Strategi ini tepat diterapkan terhadap kasus penderita yang mengalami pendarahan dimana dalam waktu bersamaan dilakukan penambahan darah disertai pemberian obat.



Gambar 2.7c. Pemberian dosis berulang diawali dosis lazim ⁽¹⁾ selanjutnya dilakukan peningkatan dosis ^(2,3,4) serta interval pemberian.

Penggunaan cara III didasarkan pendapat bahwa pemberian dosis lazim akan bersifat subterapeutik mengingat kualitas makromolekul tubuh menurun. Melalui tindakan penambahan darah akan meningkatkan kualitas makromolekul sedikit demi sedikit sehingga secara bertahap akan mendorong tercapainya kadar terapeutik.

Strategi pemberian cara IV (Tabel 2.10), dilakukan didasarkan perhitungan agar mendapatkan kadar obat pada tingkat terapi tertentu dan berlangsung cukup lama (Gambar 2.7d). Penggunaan cara IV sering dilakukan pada kelompok obat dengan klas terapi antibiotika dan kemoterapi. Jenis obat tersebut banyak berhadapan dengan masalah resistensi, sehingga selalu dilakukan pengaturan ulang terhadap regimen dosis obat.



Gambar 2.7d. Pemberian dosis berulang diawali dosis muatan ⁽¹⁾, disusul dosis pemeliharaan pada interval waktu sama ^(2,3,4).

Pada keadaan demikian penentuan dosis lazim akan selalu berubah-ubah, sehingga pemberian dosis muatan merupakan pilihan terbaik untuk mengurangi resiko masalah resistensi obat. Kesempumaan penghilangan resiko resistensi adalah penjagaan perolehan kadar terapi dalam waktu lama melalui pemberian dosis berulang pada dosis pemeliharaan.

Cara V (diawali dosis permulaan disusul ulangan dengan berbagai macam dosis pada interval waktu tak seragam), merupakan strategi pemberian dosis berulang yang cocok

diterapkan pada penderita dengan sejarah hipersensitif. Mdachi *et al.*, (1995) pernah menerapkan cara tersebut pada penggunaan diminazen aseturat untuk pengobatan tripanosomiasis domba yang tengah bunting 3-7 bulan (Tabel 2.10). Dalam penerapan tersebut diharapkan diminazen aseturat pada jumlah akumulasi tertentu, tak akan mempengaruhi perkembangan janin namun tetap mampu bersifat sebagai tripanosidal.

Tabel 2.10. Pemberian dosis berulang diminazen aseturat pada domba bunting penderita tripanosomiasis.

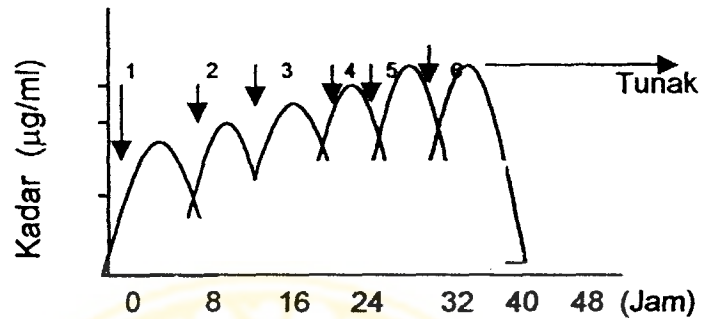
Hewan	Dosis Diminazen aseturat (i.m, mg/kg berat badan)	Interval pemberian (hari)
Domba-1	3,5	99 53
	7	
	7	
Domba-2	3,5	64 79
	7	
	3,5	
Domba-3	7	53
	3,5	

Diambil dari Mdachi *et al.*, (1995).

Cara VI adalah strategi pemberian dosis berulang hingga mencapai kadar tunak, model pemberian tersebut sering digunakan untuk mendapatkan kadar terapi pada rentang tertentu (Gambar 2.7e).

Kadar tunak suatu obat akan tercapai minimal setelah 6 kali pemberian ulangan terus menerus. Strategi tersebut sering diterapkan untuk jenis obat-obat non-antibiotika, sehingga sifat

non-rasionalitas pemberian yaitu ketidaktepatan waktu pemberian dapat dihindari.



Gambar 2.7e. Pemberian dosis berulang ^(1,2,3,4,5,6) dengan interval dan dosis yang sama akan menghasilkan kadar tunak

2.4 Disposisi dan Toksisitas Diminazen Aseturat Pada Organ dan Jaringan

2.4.1 Disposisi diminazen aseturat pada organ dan jaringan

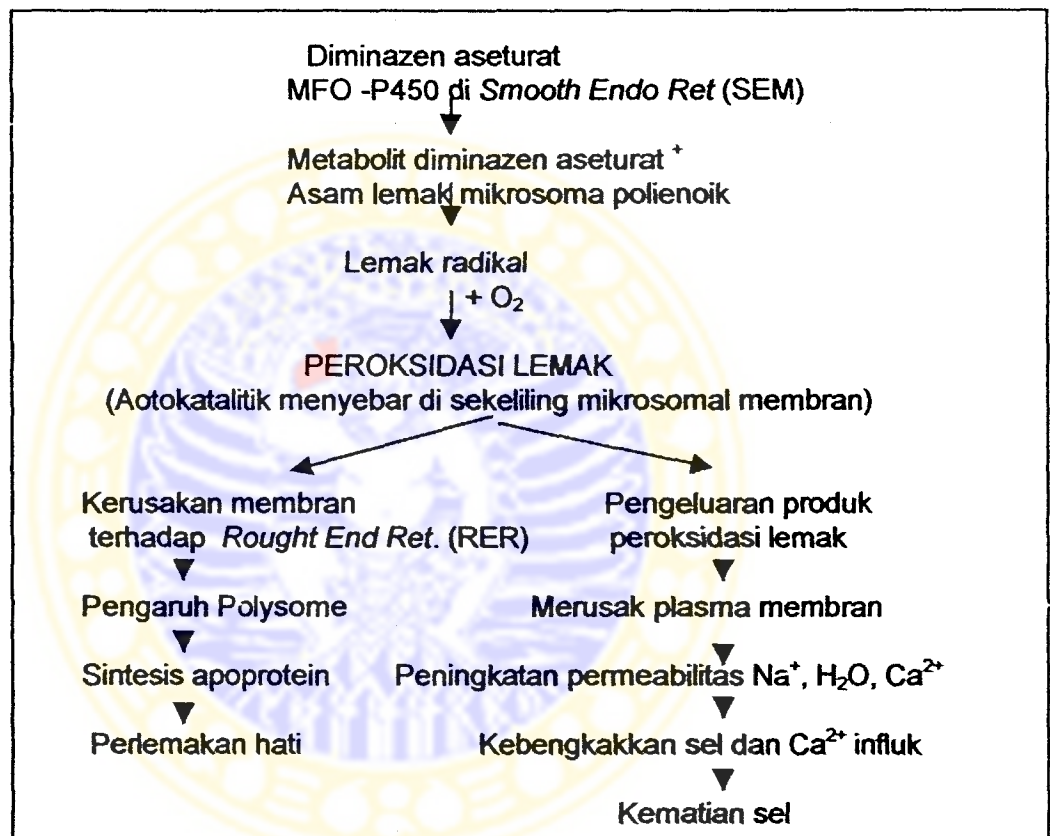
Diminazen aseturat dalam peredarannya dalam tubuh dapat terikat oleh makromolekul seperti eritrosit dan plasma bumin. Aliu, Ødegaard (1985) menyatakan bahwa perbandingan ikatan antara eritrosit dengan plasma bumin rerata berasio 0,64 : 1. Dengan demikian ikatan diminazen aseturat pada plasma bumin jauh lebih besar dibanding ikatan pada eritrosit ($\pm 70\%$ dari konsentrasi *whole blood*). Sedangkan persentase ikatan diminazen dengan protein dapat mencapai antara 65-85 %, dengan demikian obat bebas mencapai 34,20 - 14,64 %.

Ikatan obat protein pada umumnya obat dalam tubuh berlangsung ireversibel dan pada suatu saat rasio obat bebas dibanding obat terikat, makin besar sehingga terjadi akumulasi. Laporan Gilbert (1983), menunjukkan 7 hari pasca pemberian diminazen aseturat dosis lazim, residu kemoterapi dapat ditemukan pada hati kelinci sebesar $40,53 \pm 4 \mu\text{g/ml}$ (berkisar antara 35-50 % dari dosis yang diberikan).

Studi disposisi diminazen aseturat pada organ sapi bunting 3-7 bulan, pernah dilakukan oleh Mdachi *et al.*, (1995). Dalam studi tersebut dilakukan pemberian diminazen berulang diawali 3,5 mg/kg berat badan disusul 7 mg/kg berat badan interval 99 dan 53 hari kemudian serta siap dipotong pada hari ke 59-67 sejak akhir pengobatan. Hasil penelitian pada tiga subyek menunjukkan disposisi banyak ditemui pada ginjal (7,04 $\mu\text{g/g}$, 3,92 $\mu\text{g/g}$, 7,99 $\mu\text{g/g}$), hati (3,26 $\mu\text{g/g}$; 2,87 $\mu\text{g/g}$; 1,24 $\mu\text{g/g}$) dan jantung (1,79 $\mu\text{g/g}$, 1,25 $\mu\text{g/g}$, 1,03 $\mu\text{g/g}$).

Kajian disposisi obat anitripanosomiasis (isometamidium) dengan implikasi menimbulkan toksisitas pada organ dan jaringan mulai dirintis oleh Philips *et al.*, (1967) pada tikus. Dalam penelitian tersebut diuraikan bahwa hati akan mengalami pembendungan dengan ditemukan banyak sel makrofag. Bagian proksimalis ginjal tampak mengalami banyak degenerasi terutama tubulus proksimalis. Limfoglândulae submaksilaris dan pankreas dipenuhi sel nekrosis serta banyak ditemui sel hipertrofi dengan ciri khas

pendesakan inti oleh sitoplasma (inti eksentrik). Bila menganalogikan uraian Cotran *et al.*, (1999) mengenai degenerasi sel termasuk degenerasi melemak hati akibat pengaruh obat, maka kerusakan sel akibat pengaruh diminazen aseturat dapat diruntutkan seperti Gambar 2.8.



Gambar 2.8. Pengaruh diminazen aseturat pada perlemakan hati dan kematian sel

2.4.2 Toksisitas diminazen aseturat pada organ dan jaringan

Kajian toksistas diminazen aseturat pada unta menunjukkan bahwa pemberian 40 mg/kg berat badan akan mengakibatkan kematian dalam waktu 4 jam. Sedangkan pemberian 10 mg/kgberat

badan sebanyak dua kali dengan interval 3 hari, sebagian mengakibatkan kematian 5 hari kemudian dan sebagian akan memunculkan reaksi toksisitas. Reaksi toksisitas awal 15 menit pasca penyuntikan unta melakukan defikasi spontan dan 5 menit kemudian menderita hiperaesthesia (tremor, berputar-putar, urinasi sering, hipersalivasi). Pemeriksaan histopatologi pada hati unta menunjukkan bagian sentrolobuler sel hati mengalami kongesti dan *haemorrhage*, di daerah tersebut akan ditemui infiltrasi sel mononuklear, fibroblas. Sedangkan bagian vena sentralis hati dan lamina propria abomasum banyak ditemui leukosit polimorfonuklear (PMN). Ginjal dan jantung banyak ditemui sel degenerasi di daerah tubulus renalis dan sel otot jantung. Paru menunjukkan keadaan kongesti dan *haemorrhage* di daerah alveoli (Homeida *et al.*, 1981).

Gambaran toksisitas pada kuda, tak banyak diketahui namun dalam bentuk sediaan komersial banyak terjadi di daerah penyuntikan. Pengurangan rasa sakit di daerah penyuntikan dilakukan dengan menambahkan kombinasi prokain disamping antipirin sebagai senyawa stabilat (Zhang dan Bourdichon, 2002).

Bentuk toksisitas pada anjing akan ditemui keadaan nekrosis pada sel-sel organ hati, ginjal, vesika urinaria, paru, jantung dan *haemorrhages* otak. Dengan demikian batas pemberian pada anjing tidak lebih dari 3,5 mg/kg berat badan. (*The manual of tropical veterinary parasitology*, 1990; Peregrine dan Mamman, 1993). Kucing tak terlalu tahan terhadap diminazen aseturat,

sehingga dosis pemberian dibatasi hingga 2 mg/kg berat badan (Greene *et al.*, 1999).

2. 5 Hewan Coba Dalam Studi Antitripanosomiasis

2.5.1 Praperlakuan pada studi antitripanosomiasis

Kongres *Federation of Asian Veterinary Associations (FAVA)* 27-29 November 2000 di Taiwan, telah menetapkan kriteria hewan dalam pengelolaan kedokteran hewan. Hewan yang dimaksudkan adalah (1) hewan kesayangan, (2) hewan ternak/produksi (3) hewan kerja, (4) hewan liar dan (5) hewan laboratorik. Ketentuan kongres FAVA tahun 2000, dapat dijadikan dasar pentingnya penatalaksanaan hewan coba dalam lingkup veteriner, mengingat dampak fisiologi yang mampu mempengaruhi hasil penelitian. Kepentingan pengelolaan didasarkan pula atas keamanan keseimbangan ekosistem serta menghormati hak hidup ciptaan Allah SWT (*animal welfare*). Dengan demikian pengelolaan hewan coba cukup ditujukan pada keamanan habitat makhluk hidup dan hewan coba. Sebagai rujukan universal dapat menggunakan dasar ketentuan *European Community Council Directive of States* (24 November 1986) mengenai proteksi penggunaan hewan coba (*Editor's office of Veterinarski Arhiv*, 2001). Beberapa syarat mengikat adalah ketentuan mengenai sistem pemeliharaan dan keharusan tindakan adaptasi praperlakuan. Syarat lain adalah ketentuan sehat dan ketentuan tidak menggunakan anak hewan

menyusu atau betina bunting kecuali bila diperlukan (Brooks *et al.*, 1984). Dalam penerapannya sejak awal Oktober 2003, PB PDHI menghimbau adanya tindakan empati hak hidup hewan bila menggunakan hewan coba dalam aktivitas penelitian. Hak hidup dimaksudkan adalah bebas rasa (1) takut, (2) haus lapar, (3) sakit dan penyiksaan. Dalam pengelolaan harus diawasi oleh profesi terkait berdasarkan sumpah profesi (Pengurus Besar Perhimpunan Dokter Hewan Indonesia, 2003). Persyaratan tambahan adalah tetap mengikuti Peraturan Pemerintah No. 39/1995 mengenai penelitian dan pengembangan kesehatan terutama terkait dengan bahaya kepada umat manusia.

Dalam menyikapi persyaratan sehat hewan coba, pada dasar dapat dipenuhi melalui surat keterangan sehat praperlakuan dari pengelola laboratorium setempat (Mc Pherson, 1984; Hollands, 1986). Namun mengingat penatalaksanaan hewan coba praperlakuan di Indonesia, belum diatur secara khusus. Maka persyaratan sehat dapat dipenuhi melalui tindakan pemeriksaan kesehatan sendiri sesuai kebutuhan. Dengan demikian harus dilakukan pemeriksaan laboratorik sesuai kebutuhan. Selanjutnya menggunakan daftar normal faali tubuh hewan coba, akan dapat diperkirakan tingkat kesehatan hewan coba praperlakuan (Duncan, Prasse, 1986; Brooks *et al.*, 1984; Lazuardi, 1994; Hakim *et al.*, 2002).

2.5.2 Pengamanan selama penularan *Tripanosoma* dilakukan

Perlakuan hewan coba bila dilakukan penularan dengan isolat infeksius (*Tripanosoma*, *Aquired Immune Deficiency Syndrome*, dsb) maka diperlukan tindakan pengamanan. Keddie (1990) menjelaskan pengamanan yang dimaksudkan adalah mengikuti kaidah *Advisor Commitee on Dangerous Pathogen* (ACDP) yang diterbitkan oleh pemerintah Inggris tahun 1984 dan 1989.

Perhatian pokok dalam masalah pengamanan tersebut adalah (1) pengamanan antar hewan di dalam dan di luar (2) pengamanan terhadap karyawan peneliti dalam laboratorium atau masyarakat di luar laboratorium. Wujud pengamanan harus dilakukan secara berlapis sejak mulai sistem pengandangan, sekat isolasi wilayah sekitar kandang dan area tempat penelitian dilakukan.

Pengamanan lapis pertama yaitu sistem pengandangan menurut Keddie (1990) mensyaratkan harus mampu memisahkan antara hewan coba menular dengan hewan coba sehat dalam satu laboratorium. Khusus penggunaan isolat dengan karakteristik membutuhkan hewan perantara dalam siklus hidup, pengamanan kandang harus mampu menjaga invasi hewan perantara (Lazuardi, 1994; Partoutomo, 1996). Tindak pengamanan lapis ke dua dan ke tiga dilakukan dengan cara isolasi dari daerah tempat sekitar kandang serta wilayah penelitian. Soeharmi *et al.*, (2002) mencoba memodifikasi sistem pengamanan dengan menempatkan aktivitas penelitian pada tempat yang amat terisolir.

BAB 3 KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1 Kerangka Konseptual

Diminazen aseturat adalah kemoterapi antiparasit eukaryot darah dikenal memiliki indeks terapi luas terhadap beberapa spesies ternak. Diketahui pula bahwa keberadaan dalam tubuh ternak melalui harga volume distribusi, tergolong cukup dalam (*deep tissue*) kendati harga tersebut bervariasi pada setiap spesies ternak. Temuan tersebut membuka peluang untuk dilakukan upaya perancangan regimen dosis sesuai tujuan penggunaan.

Trypanosoma diketahui memiliki fenomena protein permukaan (AVS) yang bermanifestasi penimbul variasi tingkat keganasan terhadap hewan tertular (induk semang). Faktor AVS tersebut mengakibatkan parasit mampu menghindarkan diri dari ancaman kemoterapi manakala kadar berdaya tripanosidal kurang berkecukupan atau bahkan tidak berkecukupan.

Temuan data hasil studi *in vitro* menunjukkan bentuk Tripomastigot *T. congolense* dapat mati dalam waktu 30 menit pemberian diminazen aseturat $\pm 10 \mu\text{g/ml}$ sedangkan pemberian $1 \mu\text{g/ml}$ dapat mati dalam waktu 6 jam (Kaminsky *et al.*, 1994). Kajian *in vivo* 7 tahun lalu menunjukkan strain tertentu kerabat *T. congolense* mampu terbunuh dalam tubuh kambing terinfeksi (24 jam pasca infeksi) pemberian diminazen aseturat $7,2 \text{ mg/kg}$ berat badan (Silayo *et al.*, 1992).

Secara hipotetik kadar tripanosidal diminazen aseturat dalam tubuh ternak penderita tripanosomiasis dapat dikendalikan melalui perancangan regimen dosis kendati diketahui memiliki variabilitas antar spesies. Perwatakan variabilitas keberadaan kadar tripanosidal secara umum masih memiliki ciri keidentikkan dalam satu spesies. Faktor keidentikkan tersebut sangat berguna sebagai dasar konversi keperluan perancangan regimen dosis, manakala belum terdapat data spesifik mengenai perwatakan kinetik diminazen aseturat dalam satu spesies hewan.

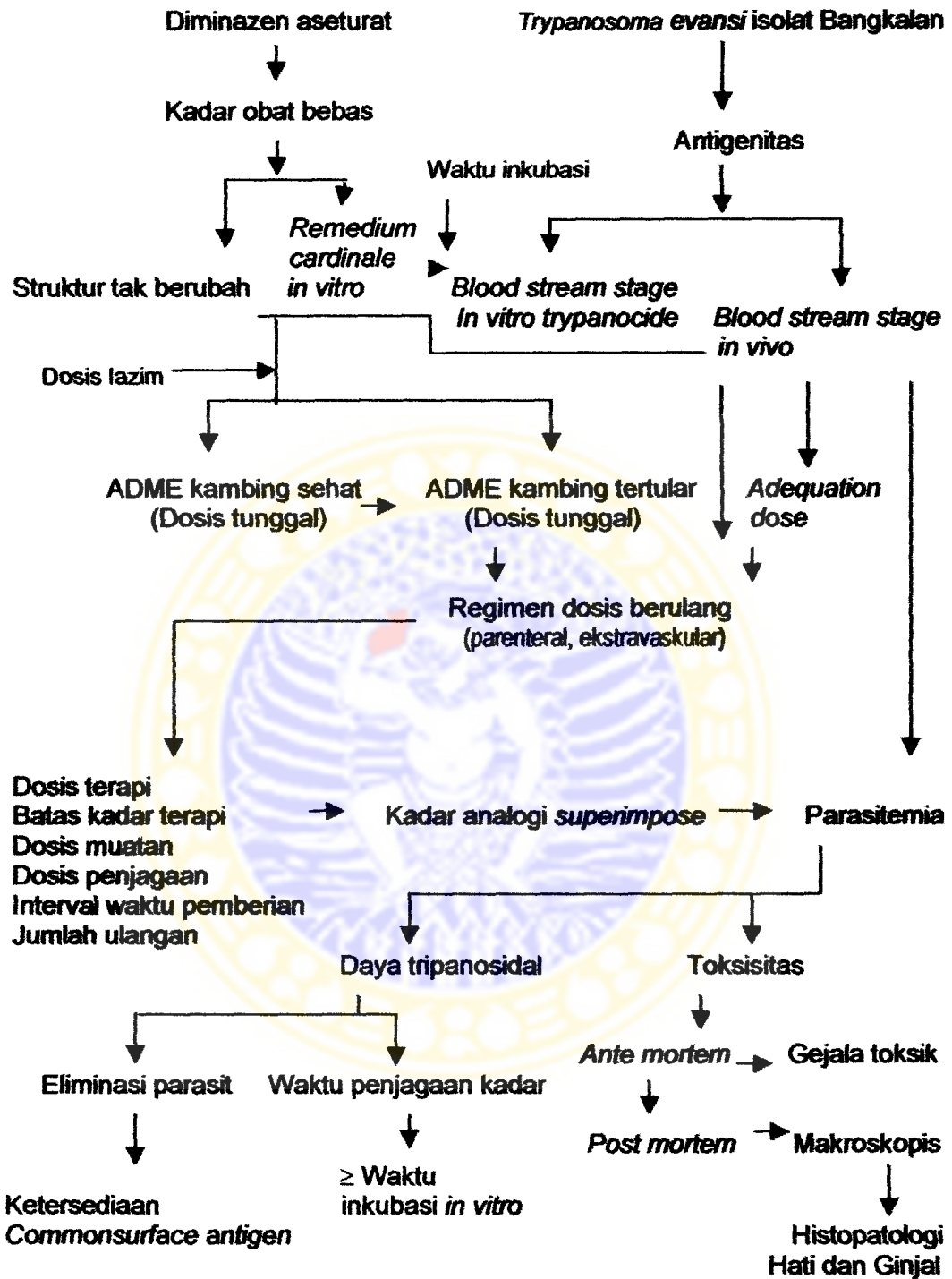
Landasan pemikiran model rancangan regimen dosis tripanosidal diminazen aseturat adalah harus mampu memunculkan suasana ancaman kemoterapi terus menerus terhadap parasit dalam aliran darah. Pada keadaan demikian akan menghambat kesempatan penghindaran kemoterapi melalui aktivitas perubahan variasi antigenik protein permukaan. Bila ancaman itu berlangsung lama maka secara perlahan-lahan akan mampu menghambat sistem respirasi sel parasit. Dampak lebih lanjut adalah kematian parasit dalam aliran darah tanpa berkesempatan melakukan perubahan bentuk menjadi amastigot, promastigot atau epimastigot.

Dikaitkan hasil temuan studi pustaka maka rancangan regimen dosis tripanosidal diminazen aseturat diduga yang paling tepat adalah suatu bentuk pemberian dosis berulang diawali dosis muatan disusul dosis pemeliharaan. Rancangan tersebut menggunakan prinsip dasar yaitu pencapaian kecukupan kadar tripanosidal

sesegera mungkin, dan mempertahankan kecukupan kadar tersebut dalam rentang waktu tertentu menggunakan prinsip superposisi. Strategi rancangan tersebut secara teoritik diperkirakan dengan mudah dapat terwujud bila ketersediaan makromolekul tubuh secara kuantitas pada penderita tripanosomiasis masih belum mengalami penurunan jumlah. Fenomena penurunan jumlah makromolekul tubuh pada penderita tripanosomiasis umumnya terjadi saat temak penderita pada kriteria diagnostik hipoalbuminemia. Lebih lanjut sketsa kerangka konseptual penelitian, seperti tampak pada Gambar 3.1.

3. 2 Hipotesis Penelitian

1. Rancangan regimen dosis pemberian berulang dapat bersifat tripanosidal terhadap *T. evansi* isolat Bangkalan
2. Rancangan regimen dosis pemberian berulang tidak menimbulkan dampak toksik bagi kambing Peranakan Etawa pasca pengobatan
3. Rancangan regimen dosis pemberian berulang mampu menghasilkan waktu penjagaan kadar lebih dari 24 jam



Gambar 3.1 Kerangka konseptual penelitian perancangan regimen dosis diminazen aseturat terhadap *Trypanosoma evansi* isolat Bangkalan

BAB 4 MATERI DAN METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

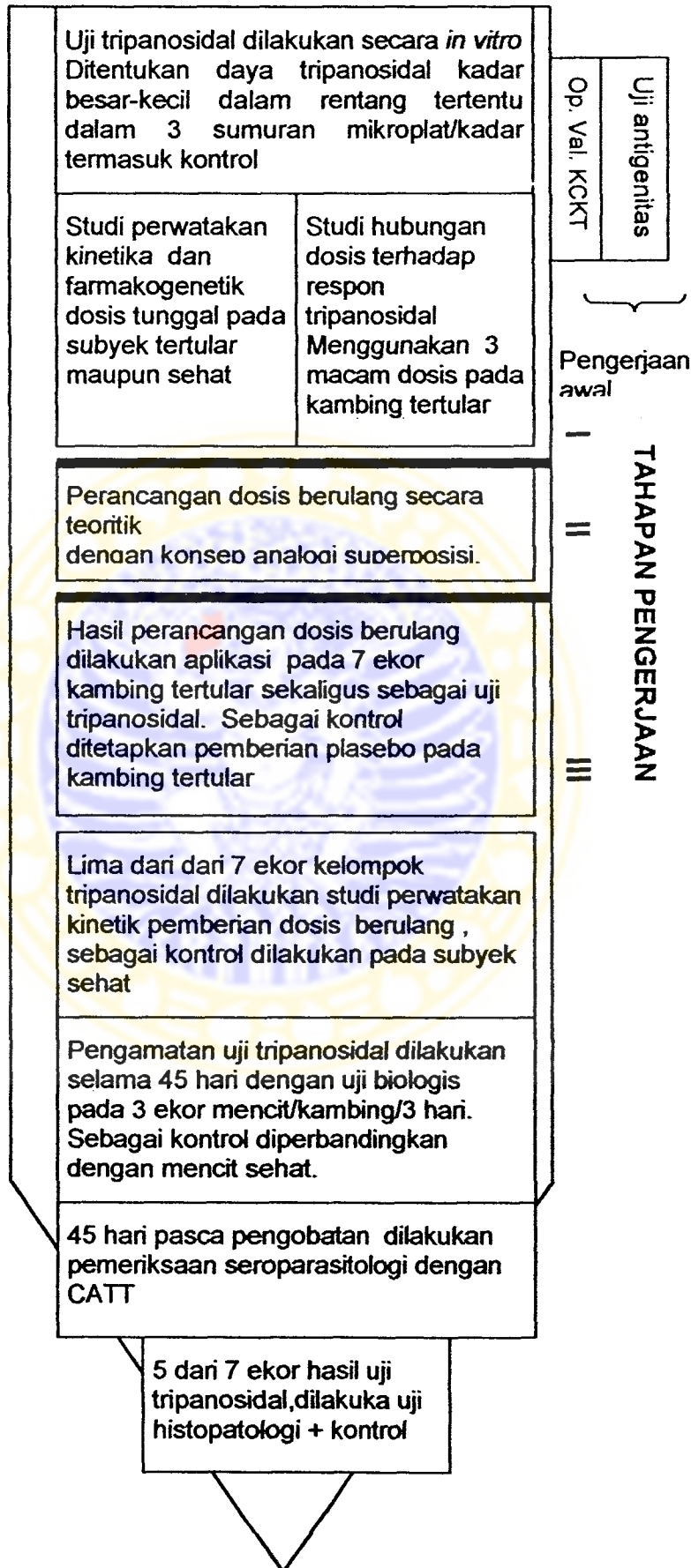
Rancangan penelitian yang dilakukan menggunakan tiga model sesuai tahapan kerja seperti tampak pada Tabel 4.1. Uraian lebih lanjut mengenai rancangan penelitian terkait tahapan kerja seperti Gambar 4.1.

Tabel 4.1 Macam Rancangan Penelitian

Tahap	Subtahapan Kerja	Rancangan Penelitian	
		<i>Design</i>	<i>Experiment</i>
I Preklinik	Studi tripanosidal <i>in vitro</i>	<i>Post test only control group</i>	<i>True</i>
	Studi antigenitas	<i>Post test only control group</i>	<i>True</i>
	Studi kinetik dosis tunggal	<i>Time series</i>	<i>Quasi</i>
	Studi dosis-respon	<i>One group pre-post test</i>	<i>Pre</i>
II Perancangan Regimen Dosis	Dosis terapi	Nihil (Hipotetik)	
	Batas kadar terapi		
	Dosis muatan		
	Dosis penjagaan		
	Interval waktu pemberian		
	Jumlah ulangan		
III Uji Klinik	Studi daya Tripaosidal	<i>Post test only control group</i>	<i>True</i>
	Uji biologi	<i>Post test only control group</i>	<i>True</i>
	Uji toksisitas	<i>Post test only control group</i>	<i>True</i>
	– gejala klinik toksik – histopatologi		<i>True</i>
	Studi perolehan waktu penjagaan kadar	<i>Time series</i>	<i>Quasi</i>
	Studi seroparasitologi	<i>Post test only control group</i>	<i>True</i>

4. 2 Kerangka Operasional

Gambar 4.1. Rangkaian kerangka operasional selama penelitian dilakukan



4.2 Populasi dan Sampel

Mengacu prediksi populasi kambing 2001-2003 Kodya Surabaya catatan tahun 2000 dari Dinas Peternakan Kodya Surabaya yang disahkan Gubernur Jatim (SK No. 524.3550/021/2004, 12-5-2004), berkisar 4390-6270 ekor. Bila 20 % dari total populasi berjenis PE maka perkiraan populasi PE 878-1254 ekor. Jumlah tersebut merupakan perkiraan populasi kambing PE di Surabaya dan sebagian kecil bakal digunakan sebagai sampel setelah diambil secara acak. Bila sampel tersebut berupa kambing PE maka jumlah sampel yang bakal diambil dari populasi di atas disesuaikan kebutuhan subtahapan kerja. Lebih lanjut rincian penggunaan jumlah dan macam sampel penelitian seperti di bawah.

4.2.1 Studi *in vitro* tripanosidal (Tahap I)

Dalam pengerjaan studi *in vitro* tripanosidal macam sampel yang digunakan adalah sumuran mikroplat mengandung *T. evansi* isolat Bangkalan. Sedangkan jumlah penggunaan sumuran mikroplat mewakili tiap kadar, mengikuti persamaan 15 (*World Health Organization*, 1992).

Persamaan 15.

$$N = \frac{\left(Z_1 - \frac{\alpha}{2} \right)^2 \cdot (S)^2}{E^2}$$

Dalam persamaan 15 asumsi yang digunakan, simpang baku (S) hasil penelitian Roostantia *et al.*, 2003 = 0,9, toleransi kesalahan (E) = 1. Bila harga $Z_1 - \frac{\alpha}{2}$ pada kepercayaan $Z_{0,95} = 1,96$, maka N (persamaan 15), = 3,1 (dibulatkan = 3). Bila tiap kadar uji diwakili 3 sumuran, maka 10 serial kadar uji dibutuhkan 30 sumuran mikroplat sedangkan kontrol dibutuhkan jumlah sama (total 60 sumuran mikroplat).

4.2.2 Uji Antigenitas parasit terhadap kambing PE (Tahap I)

Sampel kambing yang dibutuhkan dalam pengerjaan studi antigenitas adalah 3 ekor perlakuan dan 3 ekor kontrol. Penentuan jumlah sampel perlakuan didasarkan analogi jumlah penggunaan hewan coba hasil penelitian sejenis menurut Partoutomo, (1996).

4.2.3 Studi kinetik diminazen aseturat dosis tunggal (Tahap I)

Sampel yang digunakan adalah kambing PE dengan jumlah mengikuti persamaan 16.

Persamaan 16.

$$N = \frac{\left[\left(Z_1 - \frac{\alpha}{2} \right) + Z_\beta \right]^2}{\frac{(d)^2}{(S_a)^2 + (S_b)^2}}$$

Nilai $Z_1 - (\alpha/2)$ pada persamaan 16 tingkat kepercayaan 95 % = 1,96 dan Z_β pada tingkat kesalahan 5 % bernilai 1,645 (uji dua sisi). Asumsi toleransi harga beda rerata dua kelompok uji (d)

merujuk nilai MRT laporan dari Aliu, Ødegaard (1985) adalah 3,62. Perkiraan simpang baku kelompok tertular (S_a) merujuk perolehan C_{maks} laporan Mamman *et al.*, (1993) = 1,7. Perkiraan simpang baku kelompok sehat (S_b) bila merujuk hasil perolehan data MRT oleh Mamman dan Peregrine (1994) bernilai = 1,4. Seandainya harga tersebut dimasukkan dalam persamaan 16, maka di dapat jumlah sampel (N) = 4,88 ekor (dibulatkan ke atas = 5 ekor). Dengan demikian jumlah kambing 5 ekor sehat dan 5 ekor tertular. Penetapan macam dan jumlah sampel pada studi perwatakan kinetik dosis tunggal merupakan macam dan jumlah sama pada studi farmakogenetik.

4.2.4 Studi hubungan dosis terhadap respon (Tahap I)

Sampel yang digunakan adalah kambing PE dengan jumlah mengikuti persamaan 15. Dalam persamaan 15 diketahui nilai $Z_1 - \alpha/2 = Z_{0,95} = 1,96$, toleransi harga kesalahan (E) = 1. Merujuk laporan Soeharmi *et al.*, (2002) menggunakan kambing PE, diperoleh harga simpang baku (S) = 0,88. Bila tetapan nilai di atas dimasukkan persamaan 15 maka $N = 2,9$ (pembulatan = 3 ekor). Dengan demikian setiap uji dosis diperlukan 3 ekor kambing. Bila dibutuhkan 3 macam dosis, diperlukan 9 ekor.

Pemantauan respon farmakodinami dalam tubuh kambing digunakan mencit, dengan kebutuhan setiap kambing selama 3 hari sebanyak 1 ekor mencit. Bila terdapat 9 ekor kambing,

setiap 3 hari dibutuhkan 27 mencit. Bila pengamatan dilakukan selama 45 hari, maka dibutuhkan ≥ 405 ekor mencit.

4.2.5 Uji tripanosidal diminazen aseturat (Tahap III)

Macam hewan coba yang digunakan dalam uji tripanosidal pemberian dosis berulang adalah Kambing PE dengan jumlah sampel mengikuti perhitungan Tabel Rumke's (Tabel 4.2), Harga α ditetapkan 0,05, dan β 0,05 (Askandar *et al.*,1995). Asumsi yang digunakan dalam penentuan N adalah cara I memiliki kesembuhan 40 %, cara II memiliki kesembuhan 100 %, sehingga diperoleh N = 7 (total 14 ekor terdiri perlakuan dan kontrol).

Tabel 4.2. Penentuan jumlah sampel

Kesembuhan dengan cara II / regimen dosis II (%)										Kesembuhan dengan cara I / regimen dosis I (%)
10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	(%)
53	28	17	12	9	7	-	-	-	-	0
	270	83	42	26	18	13	9	7		10
		402	111	53	31	20	14	9		20
			294	128	58	32	20	13		30
				539	134	58	31	18	7	40
					539	128	53	26	9	50
						494	111	42	12	60
							402	83	17	70
								270	26	80
									53	90

4.2.6 Studi perolehan waktu kadar penjagaan (Tahap III)

Macam sampel adalah Kambing PE dengan jumlah mengikuti cara penentuan sampel pada studi kinetik dosis tunggal yaitu 5

ekor. Sehingga jumlah sampel yang dibutuhkan 10 ekor (tertular 5 ekor, sehat 5 ekor).

4.2.7 Uji toksisitas (Tahap III)

Sampel yang digunakan adalah kambing PE dengan jumlah mengikuti kaidah dalam persamaan 16, dan sesuai rujukan dari Soeharmi *et al.*, (2002), Partoutomo (1996). Asumsi toleransi tingkat kesalahan pada pemeriksaan histopatologi (E) 0,75. Bila simpang baku (S) seperti laporan Soeharmi *et al.*, (2002) 0,88, kepercayaan $Z_{0,95} = 1,96$, maka N melalui persamaan 15 = 5,3 (5 ekor). Dari hasil perhitungan tersebut diperoleh kebutuhan sampel 10 ekor terdiri 5 ekor perlakuan dan kontrol.

4.2.8 Uji biologis (Tahap III)

Sampel yang dipilih adalah darah kambing PE tertular pasca pengobatan dan disuntikan bersama-sama dengan stabilat parasit ke dalam tubuh mencit. Setiap darah dari kambing tertular pasca pengobatan yang akan diperiksa keberadaan parasit dibutuhkan 3 ekor mencit. Seluruh kambing pasca pengobatan sejumlah 7 ekor memerlukan mencit sebanyak 21 ekor setiap kali penularan. Bila penularan dilakukan setiap tiga hari selama 45-48 hari, maka dibutuhkan $\pm 315-320$ ekor mencit, dan jumlah tersebut menjadi dua kali bila digunakan kontrol (630-6640 ekor).

4.2.9 Uji Card Agglutination Test (CATT)

Sampel yang digunakan adalah serum kambing tertular pasca pengobatan. Jumlah yang digunakan 7 sampel serum hasil pengambilan 45 hari pasca pengobatan. Dalam uji tersebut kontrol serum positif dan kontrol serum negatif yang digunakan berasal dari industri pembuat CATT.

4.3 Identifikasi Variabel

4.3.1 Variabel bebas

Diminazen aseturat, *T. evansi* isolat Bangkala

4.3.2 Variabel tergantung

Kadar tripanosidal *in vitro*, antigenitas parasit, parameter kinetika dosis tunggal, dosis tripanosidal, kadar tripanosidal pemberian dosis berulang, gejala toksisitas, gambaran struktur sel ginjal, hepar, reaksi antigen-antibodi tripanosoma pasca pengobatan.

4.3.3 Confounding variable

Spesies kambing, dosis penularan, pemeriksaan Hb dan kimia klinik

4.3.4 Intervening variable

Waktu inkubasi, kambing tertular, dosis lazim dan berulang.

4.3.5 Variabel kendali

Bentuk sediaan obat, rute pemberian, fisiologis hewan (sehat, tertular, umur, jenis kelamin, asal usul hewan), teknik kerja seperti cara, jumlah, interval waktu pengambilan cuplikan darah, penularan parasit.

4.4 Definisi Operasional Varibel

4.4.1 Sehat

Sehat adalah sesuai hasil pemeriksaan yang diperbandingkan kriteria normal bidang kedokteran hewan disertai hasil pemeriksaan fenotip.

4.4.2 Seri pengenceran obat metode uji tripanosidal *in vitro*

Seri pengenceran adalah teknik pengenceran obat dalam sumuran mikroplat hasil modifikasi studi Rāz *et al.*, (1997) yang disebut metode *Alamar blue* seperti tampak pada Gambar 4.2. Seri pengenceran tambahan lebih lanjut adalah menurut Nuraini dan Lazuardi (1997). Gambar 4.2 menggunakan mikroplat 96 sumuran, jalur A, kolom 4 dan 8 dibuat kosong. Tempat yang digunakan adalah kolom 1-3, 5-7, 9-11. Seri pengenceran diawali lajur H selanjutnya diambil sesuai kebutuhan ditambahkan lajur G, demikian seterusnya dan diakhiri lajur A dengan sisa dibuang.

Cara Nuraini dan Lazuardi (1997) dilakukan dengan pembuatan stok dilanjutkan pembuatan seri pengenceran kadar obat sesuai

kehendak, dan siap dilakukan penanaman pada sumuran mikroplat berisi parasit.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
A											
B											
C	Sumuran				Sumuran				Kontrol		
D	perlakuan				perlakuan						
E	I				II						
F											
G											
H											

Gambar 4.2. Tempat sumuran mikroplat kelompok perlakuan dan kontrol. (Komunikasi pribadi dengan Dr. Reto Brun, *Swiss Tropical Institute Protozoology Lab* Socinstr 57, PO BOX CH-4002 Basel, Switzerland)

4.4.3 Klasifikasi parasitemia

- + : Dalam 1 lapang pandang pembesaran 400x : 1-5 *Tripanosoma*
- ++ : Dalam 1 lapang pandang pembesaran 400x : 6-10 *Tripanosoma*
- +++ : Dalam 1 lapang pandang pembesaran 400x : 11-20 *Tripanosoma*
- ++++ : Dalam 1 lapang pandang pembesaran 400x : > 20 *Tripanosoma*

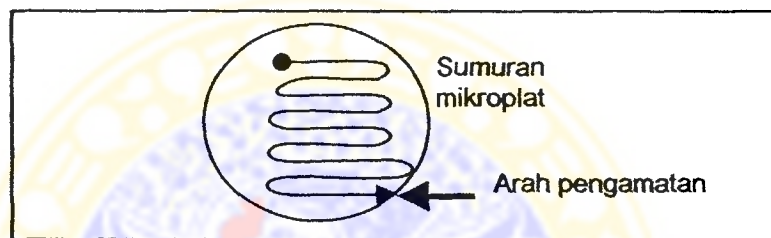
4.4.4 Antigenitas parasit terhadap ternak

Antigenitas parasit yang dimaksudkan adalah mampu menimbulkan parasitemia minimum klasifikasi (+) dalam waktu minimum 3-4 hari pasca penularan.

4.4.5 Pengamatan uji tripanosidal secara *in vitro*

Pengamatan daya tripanosidal dilakukan terhadap sumuran mikroplat yang tetap tertutup secara aseptis menggunakan mikroskop *inverted* pembesaran 200x. Bila telah ditemukan dapat

diperjelas melalui pembesaran 400x. Cara pengamatan dalam sumuran mikroplat mengikuti aturan Roostantia *et al.*, (2000) hasil modifikasi Coles (1986) serta Nuraini dan Lazuardi (1997) yaitu satu kali dari pemilihan acak awal lapangan pandang (Gambar 4.3). Bila dalam satu sumuran mikroplat tak ditemukan *Tripanosoma* maka ditandai dengan : (-), Bila dalam satu sumuran mikroplat ditemui *Tripanosoma* ditandai dengan : (+).



Gambar 4.3. Arah pengamatan pada sumuran mikroplat

4.4.6 Dosis dan rute pemberian, pengambilan cuplikan, interval waktu pengambilan cuplikan keperluan studi kinetik dosis tunggal.

Dosis diminazen aseturat pada studi kinetika dosis tunggal adalah dua kali dosis lazim (7 mg/kg berat badan dengan) rute intramuskular.

Pengambilan cuplikan darah dilakukan melalui buluh darah balik yaitu (1) percabangan *chepalicus externa* dan (2) jugularis (\pm 3,5-4 ml *whole blood*) dengan siring sekali pakai dan dihindari terjadinya plebitis. Interval waktu pengambilan cuplikan pada studi kinetika dosis tunggal pada hewan coba tertular dan sehat adalah setiap 10, 30, 50, 70, 90 120, 240, 720, 1440, 2880, 5760, 7200, 10080 menit.

4.4.7 Parameter perwatakan kinetik dosis tunggal

Termasuk dalam data farmakokinetik adalah berasal dari data darah seperti tetapan laju disposisi lambat ($\beta \text{ jam}^{-1}$), waktu paruh eliminasi ($T_{1/2} \beta \text{ jam}^{-1}$), tetapan laju disposisi cepat ($\alpha \text{ jam}^{-1}$), Laju absorpsi ($K_a \text{ jam}^{-1}$), kadar puncak ($C_{\text{maks}} \mu\text{g/ml}$), waktu puncak ($T_{\text{maks}} \text{ jam}$), Volume distribusi ($V_d \text{ l/kg}$), Area di bawah kurva ($AUC \mu\text{g/ml/jam}$), Kliren ($Cl \text{ ml/jam}$)

4.4.8 Pengamatan parameter kinetik pada studi farmakogenetik

Parameter kinetik yang digunakan sebagai pengamatan dalam studi variabilitas respon kinetik adalah laju disposisi lambat ($\beta \text{ jam}^{-1}$), waktu paruh eliminasi ($T_{1/2} \beta \text{ jam}^{-1}$), tetapan laju disposisi cepat ($\alpha \text{ jam}^{-1}$), Laju absorpsi ($K_a \text{ jam}^{-1}$), kadar puncak ($C_{\text{maks}} \mu\text{g/ml}$), waktu puncak ($T_{\text{maks}} \text{ jam}$), Volume distribusi ($V_d \text{ l/kg}$), Area di bawah kurva ($AUC \mu\text{g/ml/jam}$), Kliren ($Cl \text{ ml/jam}$). Pengamatan farmakogenetik klinik, menggunakan parameter kinetik waktu paruh eliminasi ($T_{1/2} \beta \text{ jam}^{-1}$).

4.4.9 Dosis dan rute pemberian parasit maupun diminazen aseturat pada studi hubungan dosis terhadap respon tripanosidal

Dosis penularan parasit ditetapkan sesuai temuan hasil uji antigenitas. Sedangkan rute pemberian parasit dilakukan melalui percabangan buluh darah balik jugularis dan dihindari tak terjadi plebitis. Dosis yang diujikan 3,5, 5 dan 7 mg/kg berat badan

intramuskular (muskulus vastus medialis). Pemilihan dosis uji didasarkan laporan Paramjit *et al.*, (2002) pada domba yaitu pertimbangan kenaikan $\pm 1,2-1,4$ kali dosis lazim sebagai dosis terapi adekuat. Pertimbangan lain adalah hasil aplikasi Silayo *et al.*, (1992) yaitu efektivitas dosis 7 mg/kg berat badan pada sapi.

4.4.10 Kriteria respon tripanosidal dosis tunggal

Kriteria respon tripanosidal suatu kemoterapi antitripanosoma secara *in vivo* dosis tunggal mengikuti Fairclough (1963), Wellde *et al.*, (1989), Kaminsky *et al.*, (1994), Lazuardi (1998) seperti Tabel 4.3.

Tabel 4.3 Kriteria tripanosidal kemoterapi antitripanosoma

Daya tripanosidal <i>in vivo</i>	Relapsed pasca terapi	Kepustakaan
Tidak berdaya tripanosidal	1-4 hari	Fairclough (1963) Kaminsky (1994)
Kurang daya tripanosidal	7-10 hari	Lazuardi (1998)
Berdaya tripanosidal	> 29 hari	Wellde <i>et al.</i> , (1989)

4.4.11 Perancangan regimen dosis pemberian berulang

Perancangan pemberian dosis berulang dimaksudkan merujuk cara IV pemberian berulang dalam subbab 2.3.2 (Tabel 2.10, Gambar 2.9d), terdiri dosis terapi, batas kadar terapi, dosis muatan, dosis penjagaan, interval waktu pemberian, jumlah ulangan).

Penetapan dosis terapi merupakan hasil analisis lebih lanjut pengerjaan studi hubungan dosis terhadap respon tripanosidal.

Sedangkan batas kadar terapi dihitung berdasarkan penggunaan persamaan 8 menggunakan dosis terapi.

Penetapan dosis muatan mengikuti analogi Ritschel (1992), sedangkan penetapan dosis penjagaan berdasarkan perolehan kadar tertinggi diantara beberapa pilihan dosis.

Interval waktu ulangan (τ) ditetapkan menggunakan pertimbangan Persamaan 17 dengan melibatkan dosis awal, kadar terapi efektif ($\mu\text{g/ml}$), dan rerata besaran kinetik lain pada kelompok tertular (Ristchel, 1992).

Persamaan 17.

$$\tau = \frac{1}{Kel} \times \text{Ln} \left(1 + \frac{D \cdot Fa}{\Delta'_c \cdot BW \cdot MTC} \right)$$

$$\Delta'_c = \frac{Vd}{BW}$$

Sebagai ketentuan adalah Kel = Laju eliminasi, D = Dosis, Fa = fraksi terabsorpsi, Δ'_c = koefisien distribusi, BW = berat badan, MTC = kadar tripanosidal penjagaan.

Jumlah ulangan ditetapkan berdasarkan metode analogi superposisi yaitu penumpukan kadar obat dalam tubuh setiap waktu tertentu dengan menggunakan dosis muatan dan dosis penjagaan pada interval waktu tertentu. Dasar penetapan jumlah ulangan adalah banyaknya ulangan yang mampu mempertahankan kadar \geq *Maintenance Therapeutics Concentration* (MTC) 24 jam. Persyaratan 24 jam didasarkan pertimbangan

Sedangkan interval waktu yang dipilih adalah 5, 10, 29, 50, 75, 89, 92, 100, 119, 123, 130, 149, 160, 180, 200, 240, 360, 720, 1430, 4320, 7205, 10095 menit.

4.4.14 Analisis perolehan kadar pemberian berulang

Analisis perolehan kadar pemberian berulang ditetapkan berupa penghitungan tetapan laju disposisi lambat ($\beta \text{ jam}^{-1}$), means residence time (hari) dan perolehan lamanya waktu (t) penjagaan kadar terapeutik (t) di atas kadar terapeutik (C_{pt}) minimum.

4.4.15 Toksisitas diminazen aseturat

Toksisitas dimaksudkan adalah pengaruh diminazen aseturat berlebihan pada ternak sehingga mempengaruhi naluri fisiologi ternak dan berdampak lebih lanjut pada kerusakan organ. Organ dimaksudkan adalah hati dan ginjal, sedangkan dampak kerusakan adalah hasil pemeriksaan makroskopis dan struktur sel merujuk kriteria Ressang, (1984), Meyer, Harvey, (1998). Ketetapan gejala klinik akibat pengaruh obat berlebihan, merujuk Homeida *et al.*, (1981), seperti Tabel 4.4.

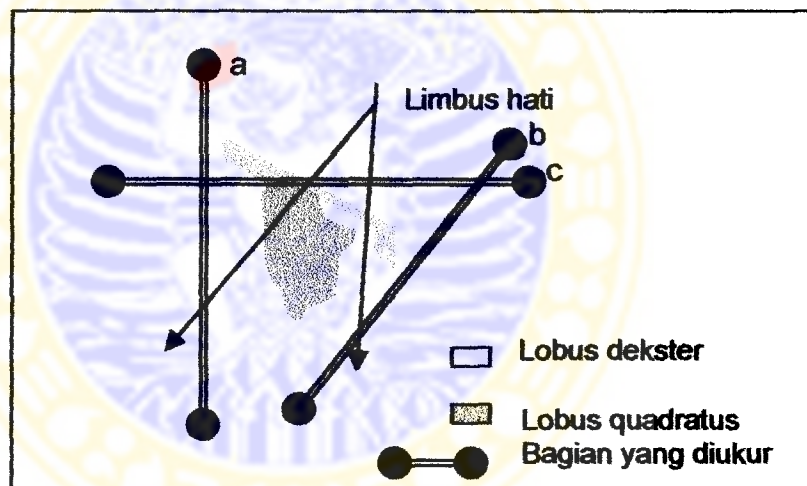
Kriteria pemeriksaan makroskopis pada hati

1. Terdapat bentuk pembesaran atau pengecilan berlebihan dibanding bentuk organ normal (Gambar 4.4).
2. Terdapat perubahan warna dibanding organ normal.

3. Bagian limbus hati terdapat pembengkakan dibandingkan normal.

Tabel 4.4 Kriteria gejala klinik akibat toksisitas

Gejala subakut		Gejala subakut	Gejala akut
No.	Menurut Homeida <i>et al</i> , 1981	Tambahan	Menurut Homeida <i>et al</i> , 1981
1.	<i>Defecation</i>	<i>Tachicardia</i>	<i>Anorexia nervosa</i>
2.	<i>Hyperaesthetic</i>	<i>Hipersalivation</i>	<i>Clonic convulsion</i>
3.	<i>Tremor</i>	<i>Oedematus alergica</i>	<i>Dyspnoe</i>
4.	<i>Itching</i>	<i>Anaphylactic shock</i>	<i>Regurgitation</i>
5.	<i>Urination frequent</i>		<i>Recumbency</i>
6.	<i>Geraham bergetar</i>		
7.	<i>Tak penurut (sulit dikendaikan)</i>		



Gambar 4.4. Daerah limbus dan tempat pengukuran bagian hati pada skema bentuk medial organ hati kambing

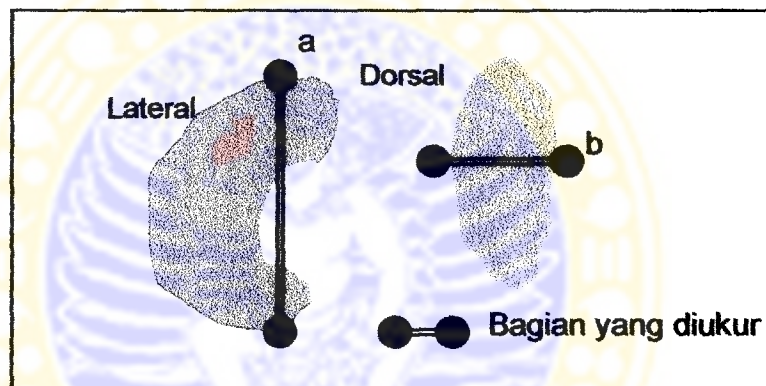
Kriteria pemeriksaan mikroskopis pada hati

1. Susunan sel hati tak teratur, demikian pula vena sentralis dan segitiga Kiernan.
2. Sel hati terdapat degenerasi mengeruh disusul degenerasi hidropik dan degenerasi melemak.

3. Sinusoid-sinusoid melebar atau tidak.
4. Terdapat tanda inflamasi (a) terjadi stakan vaskularisasi, (b) eksudasi dan (c) migrasi sel radang.

Kriteria pemeriksaan makroskopis ginjal

1. Terdapat perubahan ukuran berlebihan (membesar atau mengecil) dibanding ukuran normal (Gambar 4.5).
2. Terdapat perubahan warna dibandingkan organ normal.



Gambar 4.5. Daerah pengukuran ginjal pada gambar skematik ginjal kambing

Kriteria pemeriksaan mikroskopis ginjal

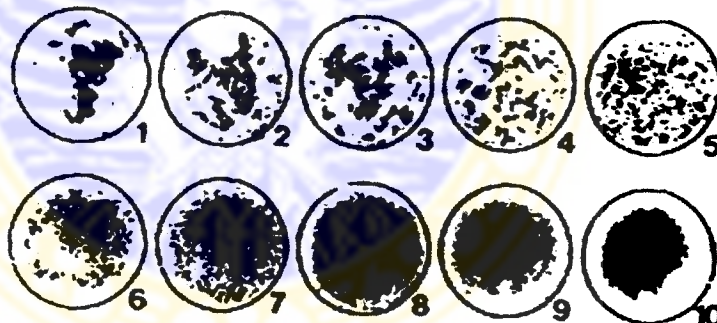
1. Sel bagian kortek, medula, terdapat tanda inflamasi yaitu haemostakan, eksudasi, migrasi sel radang. Sel parencim, sel endotel buluh darah terdapat karyolisis, sel epitel tub. proksimalis membengkok sehingga lumen mengecil.
2. Terdapat pengkerutan/pembesaran glomerulus ginjal, daerah kapsula Bowman dengan medula terdapat pelebaran berlebihan.

4.4.16 Interpretasi pembacaan pada pemeriksaan CATT

Interpretasi pembacaan hasil pemeriksaan CATT dilakukan sesuai petunjuk *Institut of Tropical Medicine laboratory of Serology*, B-2000 Antwerp/Belgium seperti kriteria Tabel 4.5 Gambar 4.6. Pembacaan dilakukan secepat mungkin melalui bantuan kontrol positif dan negatif.

Tabel 4.5. Kriteria tingkat aglutinasi

No. aglutinasi	Skor	Makna
1-3	+++	Positif kuat
4-5	++	Positif kuat
6-7	+	Positif
8	±	Positif lemah
9-10	0	Negatif



Gambar 4.6. Interpretasi pembacaan pada pemeriksaan CATT

4.5 Bahan Penelitian

4.5.1 Hewan coba

Macam hewan coba yang digunakan sebagai hewan penelitian adalah kambing Peranakan Etawa (PE), mencit (*Mus Musculus Albinus Bulb-c*) dan tikus putih (*Rattus Norvegivus strain Wistar*).

4.5.2 Asal hewan coba

Hewan coba jenis kambing PE diambil dari tempat pengepul dan pengembangbiakan kambing di Kodya Surabaya dalam lingkup pengawasan Dinas peternakan Kodya Surabaya (Lampiran 1.1). Hewan coba jenis mencit dan tikus putih diambil dari PUSVETMA Jl. A. Yani, Surabaya (Lampran 1.2).

4.5.3 Seleksi hewan coba

Persyaratan hewan coba yang digunakan berdasarkan batasan-batasan seperti pada Tabel 4.6.

Tabel 4.6 Seleksi hewan coba

Seleksi Hewan Coba					
Pre terapi		Diagnostik (Inklusi)		Ko-morbid (Eksklusi)	
Kambing	Mencit/Tikus	Kambing	Mencit/Tikus	Kambing	Mencit/Tikus
Usia \geq 24 bulan	Mencit : Usia 1-4 bulan	Usia \geq 24 bulan	Mencit : Sehat Lampiran 1.2	Diluar Kriteria Diagnostik	Mencit : Diluar Kriteria Diagnostik
Jantan	Berat 12-15 g	Berat \geq 20 Kg	Tikus : Sehat Lampiran 1.2		Tikus : Diluar Kriteria Diagnostik
Berat \geq 20 kg	Tikus : Usia 1-4 bulan	Tak makan obat-obatan			
Tinggi \geq 1,2 m	Berat 300 -400 g	Tak makan bahan kimia lain Sehat * (Tabel 4.7) Lampiran 1.1			

Kepustakaan :

- Radostits *et al.*, 2000

Tabel 4.7 Kriteria sehat hewan coba pra perlakuan

No	Bagian tubuh	Pemeriksaan	Keadaan
1.	Limfoglandulae Aksilaris Limfoglandulae illiaka eksterna Limfoglandulae prefemorialis inguinalis	Palpasi	Pembengkakan nihil
2.	Paru, reflek tekan distal pharyng	Auskultasi	Krepitasi, batuk nihil
3.	Kulit	Fenotip	Skabiosis, dermatofitosis nihil
4.	Traktus gastro intestinalis	Auskultasi, Perkusi	Timpani nihil
5.	Mata	Fenotip	Keratokonjuktivitis (<i>pink eye diseases</i>) nihil
6.	Mukosa mata, darah, feses	Hb Sahli Ulas darah	Anemi nihil Parasit darah nihil Telur cacing nihil Diarhae nihil

4.5.4 Parasit darah

Parasit yang digunakan adalah *T. evansi* hasil isolasi wabah di Madura (Bakit 87/649), diperoleh dari BALITVET, Bogor (Lampiran 2).

4.5.5 Baku diminazen aseturat, suramin dan obat

Baku murni diminazen aseturat, diperoleh dari Sigma Cemical Corp (Lampiran 3.1), suramin diperoleh dari Dinas Peternakan Propinsi Jawa Timur. Obat komersial Berenil[®] dalam sachet sesuai ketentuan Farmakope Veteriner Indonesia, 2001 (tiap g granul dalam satu sachet = 442,8 mg/g), diperoleh dari *Hoecht Roussel Vet.* (Lampiran 3.2).

4.5.6 Bahan kimia

Bahan kimia keperluan pertumbuhan dan penyimpanan parasit, studi tripanosidal *in vitro*, dosis respon yaitu Minimum Esensial Eagle Media dengan garam Earle dan HEPES, sodium bikarbonat non l-glutamin. Bahan lain adalah Minimum Esensial Eagle Media dengan garam Earle, sodium bikarbonat tanpa non esensial asam amino, 2-merkaptotanol, sodium asam piruvat. Hipoksantin, l-sistein, asam ortofosfor, dietil amino etil selulose (DEAE), *Ethylene Diamin Tetra Acetic acid* (EDTA). Bahan kimia pada pengerjaan uji tripanosidal dan CATT adalah stabilat NaCl, glucose 20 %, antigen kering beku diawetkan formaldehid dan diwarnai *Commassie Blue*.

Bahan kimia untuk preparasi yaitu metanol pro KCKT, asetonitril pro KCKT, 1-octanosulphonic acid sod. salt, trietilamin, filter selulose nitrat ϕ 0,45 μ m, asam asetat glasial, *Solid Phase Extraction* (SPE) LC-18 3 ml.

4.5.7 Peralatan

1. Kandang hewan coba

Kandang kambing PE tertular terbuat dalam rangka besi (\emptyset = 1 cm), ukuran 3,6 x 1,8 x 1,8 meter, alas papan, atap kayu multiplek. Kandang dilakukan pelapisan kawat antinyamuk dan terisolir. Kebersihan dan keamanan terjaga 24 jam, dan

penempatan Tahap I dan II di Jl. Raya Ketintang Selatan 45, dan F.K.H UNAIR, Surabaya.

2. Uji tripanosidal *in vitro*, histopatologi, CATT

Aneka peralatan diantaranya *Cryochamber* kapasitas 35 liter, mikroskop cahaya, Haemositometer, CO₂ inkubator, Hb meter Sahli, mikroskop inverted, *clean bench*, *shaker waterbath*, *vortex Genie*, *fixed dan adjusted* mikropipet 10 - 200 µl, mikrotom, *shaker* (rotator).

3. Peralatan studi perwatakan kinetika dan dosis terhadap respon

Aneka peralatan adalah refrigerator -20 °C, sentrifus, spektrofotometer UV-Vis Shimadzu A160. KCKT Agilent 1100, *variable wave length detector*. *Rheodyn type* : 77251i kapasitas 20 µl. Jenis kolom Zorbax ODS 4,6x 250 mm (φ 5 µm). Perangkat lain pH meter, siring Hamilton 100 µl, perangkat lunak SPSS 11.0, Minitab 11.0, Program Validasi (PV) dibuat berdasarkan Funk *et al.*, (1992).

4.6 Lokasi dan Waktu Penelitian

Lokasi dan waktu penelitian tahapan pengerjaan penelitian seperti tampak pada Tabel 4.8.

Tabel 4.8 Lokasi dan waktu penelitian

Aktivitas penelitian	Lokasi penelitian	Alokasi waktu	
		Mulai	Berakhir
Sudi <i>in vitro</i> tripanosidal	- Lab. PMPP PUSVETMA, Surabaya - Lab. Diarhae, TC TDC UNAIR - Lab. GRAMIK FK UNAIR	Maret 2001	Agustus 2001
Optimasi-Validasi KCKT Validasi KCKT (lanjutan)	- Lab. TAKI Teknik Kimia ITS, Surabaya - Lab. TAKI Teknik Kimia ITS, Surabaya	Juli 2001 - November 2002	Juli 2002 Februari 2003
Studi antigenitas parasit	- Lab. Gramik FK UNAIR - I.Farmasi-Kedokteran FKUNAIR - Kandang Hewan Coba R. Ketintang Selatan 45, Surabaya	Juli 2002	Agustus 2002
Studi perwatakan kinetika dosis tunggal pada individu tertular Pemeriksaan SGPT.SGOT, Kreatinin BUN	- Kandang kambing Jl. Raya Ketintang Selatan 45, Surabaya - Lab. TAKI Tek Kim ITS, Surabaya - Lab. Patologi Klinik RS Dr. Soetomo Surabaya	Juli 2002	November 2002
Hubungan dosis terhadap respon	- Kandang kambing, Jl. Raya Ketintang Selatan 45, Surabaya - I. Farmasi-Kedokteran FK UNAIR	Agustus 2002	November 2002
Studi kinetika pemberian dosis berulang individu tertular, Studi kinetika pemberian Dosis berulang individu Studi kinetika dosis tunggal	- Lab. Hewan coba FKH UNAIR - I. Farmasi-Kedokteran FK UNAIR - Lab TAKI Tek Kim ITS, Surabaya - Lab. Patologi Klinik RS Dr. Soetomo Surabaya	Februari 2003	September 2003
Uji tripanosidal Pemeriksaan histopathologi Uji biologis Pemeriksaan CATT	- Lab. Hewan Coba FKH UNAIR - Lab. Patologi Anatomi FKH UNAIR - Lab. TAKI Tek Kim ITS, Surabaya - BALITVETJL RE Martadinata, BOGOR	April 2003	18 Oktober 2003

4. 7 Prosedur Penelitian

4.7.1 Studi *in vitro* tripanosidal diminazen aseturat

Penentuan kadar tripanosidal secara *in vitro* dilakukan secara aseptik didasarkan pengerjaan Rāz *et al.*, (1997).

1. Pembuatan dua macam stok obat yaitu 90 ppm dan 25 ppm (keperluan persiapan awal pencarian rentang kadar tripanosidal).
2. Penyediaan media *in vitro* steril : Minimum Eagle Media (MEM) dengan suplemen garam Earle dan 25 mM HEPES ad 100 ml.

MEM + 1 g/l glukose + 10 mM/ MEM asam amino non-esensial (100x), + 0,2 mM 2-mercaptoetanol, 2 mM Na-piruvat, 0,1 mM hipoksantin + serum sapi 15 % (di in aktifkan melalui perendaman dalam *shaker water bath* 56 °C 30 menit). Sebagai kontrol sterilitas dilakukan pengambilan contoh 2 ml media parasit dimasukan dalam larutan Tioglikolat 10 ml dan di inkubasikan 37 °C selama 3-4 hari.

3. Pemanenan parasit hasil infeksi buatan keperluan *re-vival* parasit stok pasca penyimpanan pada N₂ cair selama 6-10 bulan. Pemanenan dilakukan saat tikus tertular penderita parasitemia positif empat seperti kriteria Raina *et al.*, (1985).
4. Persiapan penyediaan *Tripanosoma* terpisah dari sel darah sejumlah $\pm 3 \times 10^3$ *Tripanosoma*/ml medium. Jumlah tersebut akan didapat 3-4 hari pasca penularan parasit pada 2-3 ekor tikus (parasitemia positif empat). Langkah-langkah penyediaan parasit :
 - a. Pengambilan darah jantung (5-6 ml tiap ekor) + Heparin 1000 IU).
 - b. Pengumpulan darah dalam satu tempat (\pm 10-15 ml)
 - c. Penambahan PBG sama banyak. Tempat penampungan darah diletakan pada nampan berisi sedikit es batu (suhu \pm 28 °C).
 - d. Preparasi DEAE secara aseptik sesuai kebutuhan yaitu :

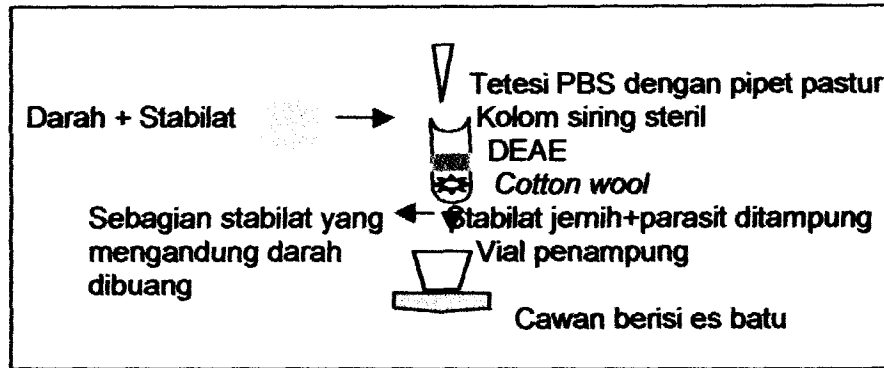
Menetapkan kebutuhan setiap 1 ml darah terinfeksi dalam PBG memerlukan \pm 5 ml DEAE 20 % (dalam PBS). Bila dibutuhkan 20 ml darah dalam PBG (10 ml darah + 10 ml PBG) memerlukan 20 g DEAE ad 100 ml PBS.

Membuat larutan PBS bebas CO₂ steril dalam keadaan panas 5-10 menit. Manfaat pemanasan PBS agar berfungsi menghilangkan gelembung udara sehingga tak terbawa saat pembuatan kolom DEAE serta mempertahankan sterilitas. Pemanasan PBS dilakukan dalam labu erlenmyer di bagian atas labu di tindih dengan kaca arloji dan diberi pemberat kelereng.

Dalam suasana mendidih segera dimasukkan DEAE sambil digoyang-goyangkan. Hasil pencampuran DEAE dengan PBS segera dilakukan homogenisasi (dengan magnetik stirer) dan dilakukan pengaturan pH (7,5-8) dengan asam ortofosfor beberapa tetes. Segera dilakukan pencucian dengan PBS dengan cara membiarkan 1-2 menit DEAE dalam PBS sehingga DEAE akan mengendap. Larutan atas DEAE dilakukan penghisapan antara 40-50 %, selanjutnya dilakukan penambahan PBS baru sebanyak yang dibuang (dilakukan 4 kali). Preparasi DEAE diakhiri dengan melakukan ekuilibrasi melalui penyimpanan -80 °C (1-2 jam).

5. **Penyiapan kolom preparasi berupa siring steril tanpa pestil sesuai kebutuhan yaitu 1 ml media darah dalam PBG membutuhkan 5 ml media DEAE dalam PBS pada 1 siring 10 ml. Pengerjaan diawali dengan memasukkan *cotton wool* steril secukupnya pada dasar siring menutup lubang keluaran. Selanjutnya dilakukan pengisian kolom siring dengan media DEAE perlahan-lahan dan akan segera menetes keluar PBG sedikit demi sedikit hingga kering. Selanjutnya dilakukan pengeringan PBG dengan mengangin-anginkan (dalam ruang steril).**
6. **Pemisahan parasit dilakukan seperti pengerjaan Lanham (1968) dengan langkah-langkah :**

Memasukkan perlahan-lahan media darah dalam kolom siring. Dilakukan penambahan PBG untuk mendorong keluar dengan pipet pasteur. Lama elusi membutuhkan rentang waktu antara 2-3 menit pasca pemberian darah dengan ketentuan media darah belum ikut keluar bersama PBG.
7. **Dilakukan penampungan filtrat hasil elusi. Penampungan dapat dilakukan pada tabung sentrifus steril dengan tetap menjaga suhu agar tetap dingin (merendam penampungan dalam es). Langkah pengerjaan pemisahan parasit dari sel darah merah secara praktis, dapat diikuti pada Gambar 4.7.**



Gambar 4.7 Teknik preparasi *Trypanosoma* dari sel darah

8. Filtrat hasil elusi dalam setiap tabung sentrifus dilakukan pengumpulan hingga diperoleh 10 ml filtrat stok. Selanjutnya dilakukan pengenceran 1 : 1000 dan dilakukan penghitungan parasit.
9. Penghitungan dilakukan menggunakan bantuan Thoma berdasarkan persamaan 18 dimana x adalah hasil penghitungan sebelum dilakukan pengenceran.

Persamaan 18.

$$\frac{x}{4} \times 10^4 \times \text{pengenceran}$$

10. Hasil penghitungan dilakukan penyesuaian jumlah *Trypanosoma* setiap ml PBG seperti jumlah yang dikehendaki (tiap satu sumuran 50 μ l media-parasit mengandung $\geq 3 \times 10^2$ *Trypanosoma*). Bila mikroplat yang digunakan 96 sumuran, maka perkiraan jumlah media-parasit yang diperlukan ≥ 5 ml

mengandung 3×10^4 *Trypanosoma*. Tahapan lanjutan adalah segera memasukan dalam sumuran mikroplat.

Tahapan pengerjaan dalam sumuran mikroplat adalah sebagai berikut :

1. Setiap sumuran ditambahkan 100 μ l medium *Trypanosoma* MEM mengandung garam Eagle's + 25 mM HEPES, + 1 g/l glukose, 10 mM MEM non asam amino esensial, 0.2 mM 2-Merkaptoetanol, 2 mM Na-piruvat dan 0,1 mM hipoksantin dan 15 % serum kuda in aktif.
2. Pada jalur H dilakukan penambahan 25 μ l Stok obat I (perlakuan I) dan stok obat II (perlakuan II) dan segera dilakukan pengenceran 1 : 3 seperti pengerjaan Rāz *et al.*, (1997).
3. Dilanjutkan penambahan 3×10^2 *Trypanosoma* 50 μ l tiap sumuran mikroplat, dan segera inkubasi selama 24 jam dalam 5 % CO₂ inkubator. Sebelum mengakhiri kerja semua media uji termasuk parasit diambil 1 ml masukkan ke media Tioglikolat inkubasi 24 jam 37 °C (pembuatan Tioglikolat pada Lampiran 4).
4. Pasca inkubasi 24 jam media Tioglikolat diperiksa dan bila diketahui steril segera melakukan pengamatan mikroplat menggunakan mikroskop inverted sekaligus mencari rentang kadar tripanosidal.

Bila telah ditemukan kadar tripanosidal, dilakukan pembuatan serial kadar tripanosidal lebih rinci pada rentang yang telah ditemukan (Roostantia *et al.*, 2003). Selanjutnya dilakukan uji kadar tripanosidal dalam sumuran mikroplat seperti halnya pengerjaan sebelumnya. Kontrol negatif adalah sumuran mikroplat mengandung parasit namun tak dilakukan penambahan obat. Kontrol positif digunakan suramin dengan pengenceran 0,01 ppm hingga 10 ppm.

4.7.2 Studi antigenitas parasit pada kambing PE

Pengerjaan studi antigenitas diawali dengan langkah-langkah sebagai berikut :

1. Pasase parasit sebanyak mungkin dalam tubuh tikus (5-7 ekor tikus setiap ekor kambing), 3-4 hari pasca inokulasi dipanen dan dihitung.
2. Penyiapan hewan coba, pemeriksaan Hb (3 ekor perlakuan, 3 ekor kontrol) dan segera dilakukan penularan pada kelompok perlakuan setiap interval 12 jam (dosis $\geq 5 \times 10^5$ sejumlah $\pm 1,5-2$ ml).
3. Pemeriksaan hewan tertular kelompok perlakuan dilakukan setiap hari (antara 22.00 WIB-23.00 WIB) melalui pemeriksaan suhu rektal dan ulas darah tebal. Penularan terhadap hewan tertular dilakukan terus-menerus hingga diketemukan kemunculan tingkat parasitemia pada pemeriksaan ulas darah

tebal. Kelompok kontrol diperlakukan sama kecuali matrik penularan berupa stabilat parasit.

4. Saat parasitemia, dilakukan pemeriksaan Hb pada kelompok perlakuan

4.7.3 Optimasi dan validasi Kromatografi Cair Kinerja tinggi (KCKT)

Pelaksanaan optimasi KCKT

1. Penetapan protokol kerja dan penetapan panjang gelombang diminazen aseturat. Protokol kerja penetapan kadar ditentukan berdasarkan modifikasi penelitian oleh Gummow (1993) dan metode Gummow *et al.*, 1995. Penentuan panjang gelombang didasarkan atas pilihan yang telah dicobakan oleh Gummow *et al.*, 1994 dan Gummow *et al.*, 1995. Asumsi yang digunakan adalah bila kelak dipilih KCKT detektor UV-Vis sebagai instrumen penetapan kadar, maka panjang gelombang analit terpilih tidak boleh mendapatkan gangguan puncak. Pertimbangan tambahan adalah panjang gelombang terpilih harus memiliki puncak tertinggi diantara dua panjang gelombang maksimum diminazen aseturat dalam air yang telah diketahui (Lampiran 5).
2. Pengerjaan optimasi dilakukan mengacu metode Gummow 1993, Gummow *et al.*, 1994 dan Gummow *et al.*, 1995 yaitu menggunakan metode isokratik. Fase mobil berupa fraksi Air-Asetonitril (70%:30%) mengandung pasangan ion 0,005 M 1-

octano sulphonic acid sod. Salt dan 0,1 % Trietilamin. Keasaman fase mobil ditetapkan harus mencapai pH 5,5 melalui penambahan asam asetat glasial. Dalam penggunaan KCKT kecepatan alir fase mobil diatur 0,5 ml/menit dengan perkiraan waktu henti 30 menit, sedangkan suhu kolom diatur pada 28 °C. Pengaturan kromatogram pengolah puncak ditetapkan sebagai berikut : (1) *initial slope sensitivity* 0,3952, (2) *initial peak width* 0,14, (3) *initial area reject* 0,758, (4) *initial heigh reject* 0,0451, (5) *initial shoulders* diatur off.

3. Langkah pengerjaan optimasi diawali penyuntikan pertama kali eluen fase mobil, selanjutnya dilakukan penyuntikan baku diminazen aseturat 0,5 ppm hingga 1 ppm. Hasil kromatogram analit yang dimunculkan, ditetapkan sebagai waktu tambat analit.
4. Pembuatan larutan baku diminazen aseturat dalam air secara seksama serial 0,1 ppm hingga 3,5 ppm dan dilakukan penyuntikan. Area kromatogram yang didapat digunakan untuk penetapan kadar diminazen aseturat pada langkah pengerjaan lebih lanjut (validasi).

Validasi

Tahapan pengerjaan validasi terdiri penentuan harga perolehan kembali (*recovery*), presisi, linieritas, batas deteksi dan batas kuantifikasi. Protokol preparasi sampel plasma, mengikuti modifikasi Gummow 1993, Gummow *et al.*, 1995. Khusus

pengerjaan validasi merujuk kombinasi dari Gummow (1993) dan Gummow *et al.*, (1995), serta pertimbangan cara Klecker, Collins (1985); Supko, Malspeis (1990), Lazuardi (1994).

Persiapan dalam pengerjaan validasi adalah pembuatan larutan elusi, pembuatan larutan *clean up*, pembuatan larutan Na-EDTA.

- a. Larutan elusi dibuat dari fraksi asetonitril : air (90 % : 10 %) mengandung 0,025 M 1-octano sulphonic acid sod. salt dan 2 % asam asetat glasial (pH 3,8).
- b. Larutan clean up dibuat dari fraksi metanol : air (10 % : 90 %).
- c. Larutan Na-EDTA dibuat kadar 0,005 M dalam aqua pro injeksi.

Pengerjaan validasi dilakukan dengan terlebih dahulu mengumpulkan plasma satu ekor kambing PE buatan \pm 100 ml. Selanjutnya dilakukan pembuatan stok diminazen aseturat secara seksama dalam air 100 ppm dan segera diencerkan menggunakan plasma buatan.

Pengerjaan recovery dan presisi

Dilakukan pembuatan serial kadar diminazen aseturat dalam plasma buatan 0,25 $\mu\text{g/ml}$, 0,5 $\mu\text{g/ml}$, 1 $\mu\text{g/ml}$, dan 2 $\mu\text{g/ml}$ dengan replikat setiap kadar lima kali (vortek 20 detik).

Setiap serial kadar pengenceran segera dilakukan preparasi dengan langkah sebagai berikut :

Preparasi analit dalam plasma buatan

1. Dalam tabung sentrifus ditambah secara seksama 1 ml analit dalam plasma buatan.
2. Ditambah metanol pro KCKT 1 ml (vortek 20 detik untuk memecah ikatan obat – makromolekul).
3. Ditambah larutan Na-EDTA 2 ml, vortek 20 detik
4. Dilakukan sentrifugasi 3500 rpm 10 menit
5. Bagian supernatan ditambah Na-EDTA 1 ml hingga perbandingan Na-EDTA dengan metanol 75 : 25 %.

Solid Phase Extrction (SPE)

1. Mulai diaktifkan SPE dengan penambahan 3 ml metanol pro KCKT
2. Ditambahkan 2 ml Aqua pro injeksi
3. Supernatan yang mengandung analit hasil sentrifugasi (4 ml) dimasukan dalam SPE. Kapasitas SPE 3 ml oleh karena itu pemasukan dilakukan secara bertahap (a) pemasukan pertama 3 ml dan ditunggu beberapa menit hingga volume menurun disusul (b) pemasukan ke dua 1 ml.
4. Dibiarkan beberapa menit hingga seluruh volume supernatan habis mengalir
5. SPE ditambahkan larutan *clean up* 2 ml, dibiarkan beberapa saat hingga volume habis mengalir
6. SPE dikeringkan menggunakan *full vacuum*

7. Disiapkan tabung penampungan (10 ml) di bagian bawah SPE
8. SPE ditambahkan larutan elusi 3 ml
9. Larutan elusi di tampung dalam tabung penampungan yang telah disiapkan
10. Tabung penampungan segera dimasukkan dalam penangas air hangat (tak lebih dari 35 °C) sambil dilakukan pengeringan. Pengeringan dilakukan dengan meniupkan gas nitrogen dipermukaan larutan elusi.
11. Pasca tindakan butir 10 akan ditemukan keadaan kristal kering mengandung analit dalam tabung penampungan.
12. Kristal kering dalam tabung penampungan ditambah 1 ml larutan fase mobil dan vortek 20 detik.
13. Larutan fase mobil 1 ml mengandung analit dalam tabung penampungan dilakukan filtrasi secara hati-hati (\varnothing 20 μ m).
14. Hasil filtrasi ditampung dalam vial kaca gelap ditutup aluminium foil dan dilakukan penyuntikan (kapasitas siring 100 μ l).

1. Penghitungan *recovery*

Penghitungan *recovery* dilakukan melalui analisis (%) harga perolehan kembali dengan cara membandingkan kadar analit dalam plasma dengan kadar analit dalam air, dikalikan 100 %. Kadar analit dalam plasma dihitung berdasarkan area

kromatogram melalui kurva baku diminazen aseturat dalam air. Penghitungan persentase harga perolehan kembali dilakukan pada setiap ulangan dari empat kadar analit dalam plasma buatan.

2. Penghitungan presisi

Penghitungan presisi dilakukan dengan menilai harga (%) koefisien variasi lima ulangan perolehan kadar analit dari empat pengenceran (0,25 $\mu\text{g/ml}$, 0,5 $\mu\text{g/ml}$, 1 $\mu\text{g/ml}$ dan 2 $\mu\text{g/ml}$).

Pengerjaan linieritas

Dalam pengerjaan linieritas dibutuhkan \geq lima kadar analit dalam plasma buatan pada rentang antara 0 –2 ppm. Diketahui telah dilakukan pada kadar 0,25 $\mu\text{g/ml}$, 0,5 $\mu\text{g/ml}$, 1 $\mu\text{g/ml}$ dan 2 $\mu\text{g/ml}$, sehingga kadar ke lima ditetapkan 1,5 $\mu\text{g/ml}$ dengan lima replikat.

1. Dilakukan pengenceran diminazen stok dalam plasma buatan menjadi 1,5 $\mu\text{g/ml}$ sebanyak lima replikat.
2. Selanjutnya dilakukan preparasi seperti halnya pengerjaan *recovery* dan presisi.
3. Dilakukan pemisahan analit dari plasma buatan dengan SPE. Masing-masing disuntikan dan diperoleh area kromatogram.

4. Selanjutnya menggunakan Program Validasi (PV) dilakukan analisis hubungan kadar ($\mu\text{g/ml}$) dengan area kromatogram.

Pengerjaan batas deteksi dan batas kuantifikasi

1. Dilakukan pembuatan stok diminazen aseturat dalam air secara seksama 1 ppm.
2. Stok dilakukan pengenceran serta dilakukan penyuntikan hingga menjadi suatu kuva linier, dan suatu saat ditemui kadar terkecil analit tak menghasilkan area kromatogram.
3. Menggunakan PV ditentukan batas deteksi dan batas kuantifikasi (batas deteksi dinyatakan sebagai X_p berdasarkan Persamaan 19 oleh Funk *et al.*, 1992).

Persamaan 19.

$$X_p = 2.Sx_0 \cdot T_{\text{tabel}} \cdot \sqrt{\frac{1}{N} + 1 + \frac{(Y_p - Y)^2}{b^2 \cdot Q_{xx}}}$$

Dimana

$$Y_p = a + S_y \cdot T_{\text{tabel}} \cdot \sqrt{\frac{1}{N} + 1 + \frac{X^2}{Q_{xx}}}$$

$$Q_{xx} = \sum X_i^2 - \frac{1}{N} (\sum X_i)^2$$

T tabel = student t-factor (f = N-2, P=95 %)

Kurva baku diminazen aseturat dalam plasma

Kurva baku keperluan penentuan kadar sampel dibuat dalam plasma buatan dengan rentang baku diminazen aseturat antara 0,25 $\mu\text{g/ml}$, 0,5 $\mu\text{g/ml}$, 1 $\mu\text{g/ml}$, 1,5 $\mu\text{g/ml}$, 2 $\mu\text{g/ml}$. Model

pengerjaan tersebut merujuk modifikasi metode Gummow (1993) dan modifikasi Gummow *et al.*, (1995) serta pertimbangan modifikasi Klecker, Collins (1985) dan Supko, Malspeis (1990). Penetapan kadar diminazen aseturt sampel di atas kadar kurva baku dilakukan pengenceran 10 kali atau 100 kali.

4.7.4 Studi kinetik dosis tunggal (termasuk studi farmakogenetik)

1. Studi kinetika dosis tunggal diawali penyiapan individu berupa pemeriksaan kesehatan fenotip tubuh seluruh hewan coba serta kimia klinik SGPT, SGOT, Kreatinin dan BUN termasuk Hb
2. Kelompok perlakuan dilakukan penularan parasit (dosis penularan = temuan dosis hasil uji antigenitas) hingga ditemui kondisi parasitemia.
3. Dilakukan pemeriksaan perkembangan parasitemia secara WBF baik dengan pewarnaan Giemsa maupun *Acridine orange* (Lampiran 4).
4. Beberapa saat setelah ditemukan bentukan Tripomastigot, dilakukan penyuntikan diminazen aseturat 7 mg/kg berat badan intra muskular.
5. Pengambilan cuplikan sesuai subbab 4.4.6, selanjutnya disentrifugasi, dan plasma disimpan – 20 °C hingga pengerjaan penetapan kadar.
6. Kelompok kontrol diperlakukan seperti halnya kelompok tertular, perbedaanya hanya tak dilakukan penularan parasit.

7. Penghitungan kadar obat dalam plasma dilakukan seperti langkah-langkah pengerjaan validasi dan melalui bantuan kurva baku dalam plasma maka dapat diperoleh kadar diminazen dalam plasma.
8. Perolehan kadar diaplikasikan dalam rajah grafik semilog untuk penghitungan besaran parameter kinetik, pada saat sama dilakukan analisis variabilitas harga parameter keperluan studi farmakogenetik.

4.7.5 Studi hubungan dosis terhadap respon tripanosidal

1. Dilakukan penetapan dosis uji (3,5, 5 dan 7 mg/kg berat badan).
2. Seluruh individu uji dilakukan pemeriksaan kimia klinik SGPT, SGOT, Kreatinin, BUN dan Hb.
3. Pemilahan tiga kelompok uji untuk tiga macam dosis uji (setiap kelompok terdiri dari 3 ekor).
4. Dilakukan penularan *T. evansi* isolat Bangkalan dengan tatalaksana seperti halnya pada pengerjaan uji antigenitas.
5. Bila telah ditemukan keadaan parasitemia + atau ++ segera dilakukan pengobatan, serta dilakukan pemeriksaan parasit. Tindakan pemeriksaan dilakukan secara teratur setiap hari hingga 45 hari (1,5 bulan) pasca pengobatan. Pemeriksaan dilakukan didasarkan kemunculan kembali hasil pengobatan

(Tabel 4.3). Tepat 1,5 bulan perlakuan dihentikan dan dilakukan analisis untuk mendapatkan dosis efektif tripanosidal 100 %.

4.7.6 Perancangan regimen dosis pemberian berulang

1. **Dosis terapi** ditentukan berdasarkan analisis probit hasil pengerjaan hubungan dosis terhadap respon tripanosidal (Saunders dan Fleming, 1971).
2. **Batas kadar terapi** ditentukan menggunakan Persamaan 8 dengan menggunakan dosis terapi efektif serta rerata besaran kinetik termasuk T_{maks} perwatakan kinetik dosis tunggal individu tertular.
3. **Dosis muatan** ditentukan melalui penghitungan dua kali dosis terapeutik. Penetapan dua kali dosis terapi mengikuti analogi aturan "Jempol" (Persamaan 20) dengan R = rasio dosis, D^* = dosis muatan, D = dosis terapi.

Persamaan 20.

Aturan "Jempol" (Ritschel, 1992).

$$R = \frac{D^*}{D} = \frac{2}{1} \text{ dimana interval waktu pemberian } (\tau) \leq T_{1/2}\beta.$$

4. **Dosis penjagaan** ditentukan di antara dua pilihan dosis (Dosis I dan Dosis II) yang menghasilkan kadar batas terapi tertinggi (C_p).
 - a. Dosis I = dosis terapi
 - b. Dosis II = dosis aplikasi pelacakan perwatakan kinetik pemberian tunggal pada penderita tertular

Cara menentukan :

Dosis I dimasukkan secara teoritik melalui persamaan 8 untuk mendapatkan kadar tertinggi (C_{maks}) waktu tertentu (T_{maks}) menggunakan harga rerata kinetik dosis tunggal penderita tertular. Bila perolehan batas kadar terapi hasil penghitungan persamaan 8 < dari harga rerata kadar maksimum penderita tertular, maka pilihan dosis penjagaan adalah dosis II.

5. **Interval waktu pemberian** ditentukan menggunakan persamaan 17 dengan melibatkan dosis muatan, kadar terapi efektif dan rerata besaran kinetik dosis tunggal penderita tertular.
6. **Jumlah ulangan** ditentukan berdasarkan banyaknya ulangan yang dapat mendapatkan kadar \geq Maintenance Therapeutic Concentration (MTC) setidaknya 24 jam. Persyaratan 24 jam didasarkan pertimbangan pengerjaan analogi studi *in vitro* oleh Roostantia *et al.*, (2000) yaitu evaluasi sel eukaryot dilakukan pasca inkubasi 24 jam. Pertimbangan tambahan adalah rentang 6-20 jam merupakan masa inkubasi optimum menilai kinerja obat terhadap *T. congolense in vitro* (Kaminsky *et al.*, 1994).

4.7.7 Uji tripanosidal, pengamatan toksisitas ante mortem, uji perolehan waktu kadar penjagaan dan uji biologis

Dalam uji tripanosidal juga dilakukan uji-uji lain seperti (a) pengamatan toksisitas ante mortem, (b) uji perolehan waktu kadar penjagaan dan (c) uji biologis, dengan langkah sebagai berikut :

1. Melakukan pemilahan kambing perlakuan pada 14 ekor individu tertular (7 ekor dengan obat dan 7 ekor tanpa obat) sesuai jenis uji. Seluruh kambing dipergunakan secara bersamaan pada serangkaian uji. Khusus pada uji toksisitas *ante mortem* dan perolehan waktu kadar penjagaan hanya diambil lima dari 7 ekor (Tabel 4.9).

Tabel 4.9 Pemilahan kambing perlakuan pada uji klinik

Macam uji		No. kambing tertular <i>T. evansi</i> isolat Bangkalan													
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Tripanosidal	Terapi	Cyde-1	Cyde-2	Cyde-3	Cyde-4	Cyde-5	Cyde-6	Cyde-7							
	Non Terapi	K-1	K-2	K-3	K-4	K-5	K-6	K-7							
Toksisitas ante mortem	Terapi	P-1	P-2	P-3	P-4	P-5									
	Non Terapi	K-1	K-2	K-3	K-4	K-5									
Perolehan waktu kadar penjagaan	Terapi	Sakit-1	Sakit-2	Sakit-3	Sakit-4	Sakit-5									
	Non Terapi	Sehat-1	Sehat-2	Sehat-3	Sehat-4	Sehat-5									
Biologis	Terapi	♦	♦	♦	♦	♦									
	Non Terapi	√	√	√	√	√									

Keterangan : ♦ → Darah kambing tertular pasca terapi

√ → Kontrol (darah positif + stabilat)

2. Dilakukan penandaan Cyde dan K untuk uji tripanosidal, P dan K untuk pengamatan toksisitas *ante mortem*, sakit dan sehat untuk perolehan waktu kadar penjagaan. Khusus uji biologi

penandaan adalah darah kambing tertular pasca terapi dan kontrol

3. Dilakukan pemeriksaan SGPT, SGOT, Kreatinin, BUN, Hb.
4. Penyiapan stok penularan berupa 3 ekor tikus putih setiap ekor kambing tertular. Perlakuan kedua kelompok kambing di buat seseragam mungkin dan dalam satu masa tindakan (± 55 hari).
5. Dilakukan penularan secara terus menerus sambil dilakukan pengamatan parasit secara *whole blood film* (WBF) hingga muncul kondisi parasitemia seperti pengerjaan studi antigenitas.
6. Bila keadaan parasitemia + atau ++ ditemui dilakukan pemeriksaan Hb dan segera di beri pengobatan pada 7 ekor kambing tertular. Individu lain (7 ekor tanpa pengobatan) diperlakukan serupa kendati dilakukan penyuntikan stabilat parasit. Pengamatan perkembangan parasitemia dilakukan secara terus menerus hingga berakhirnya masa penelitian (45 hari pasca pengobatan). Pengamatan parasitemia dimaksudkan adalah merupakan bagian pengerjaan uji tripanosidal pada dua kelompok (cyde-1 hingga cyde-7 dan K-1 hingga K-7). Pengamatan perkembangan parasitemia makin diperketat sejak pertama kali diminazen aseturat diberikan terutama mengenai eliminasi parasit
7. Saat dilakukan pemberian dosis pertama, mulai dilakukan pengerjaan pengamatan gejala toksik pada lima ekor masing-masing kelompok (P1 hingga P5 dan K1 hingga K5).

Pengamatan gejala toksik dilakukan terus menerus hingga 45 hari pasca pengobatan. Pengamatan gejala toksik dilakukan merujuk modifikasi temuan Homeida *et al.*, (1981) dan Rahardjo (1995), berdasarkan *checklist* yang ditetapkan (Lampiran 6.1). Gejala toksik lain di catat pada kolom khusus baik saat kemunculan dan saat menghilang.

8. Seiring dilakukan uji tripanosidal, dilakukan pengerjaan perolehan waktu kadar penjagaan (sakit-1 - sakit-5 dan sehat-1 - sehat-5) dan uji biologis (kelompok $\diamond 1$ hingga $\diamond 7$ dan $\sqrt{1}$ hingga $\sqrt{7}$), dengan langkah:
 - a. Selang 5 menit pasca pengobatan dilakukan pengambilan cuplikan *whole blood* setiap ekor keperluan uji perolehan kadar penjagaan untuk diperoleh plasma dan simpan -20°C hingga saat preparasi. Tatalaksana pengambilan cuplikan mengikuti ketentuan subbab definisi operasional variabel 4.5.13. Preparasi dan kuantifikasi kadar dilakukan seperti pengerjaan subbab validasi (4.7.3). Kadar sampel dimasukkan rajah grafik semilog dan dilakukan analisis perolehan waktu kadar penjagaan ≥ 24 jam (termasuk harga MRT).
 - b. Seiring dengan pemeriksaan *whole blood film*, dilakukan uji biologis pada 14 ekor kambing perlakuan dengan langkah :
Setiap 3 hari dilakukan pengambilan darah sentral (v. *jugularis*) $\pm 0,1$ ml ditambahkan 0,1 stabilat dan disuntikan

ke mencit (intra peritoneal). Tindakan tersebut dilakukan sejak dosis terakhir hingga 45 hari kemudian. Mencit tertular setiap hari dilakukan pemeriksaan parasitemia secara WBF (200x) melalui *v. coccygea*.

Hari ke 30 dilakukan pemeriksaan Hb seluruh kambing. Tepat 45 hari pasca uji biologis dilakukan pengambilan *whole blood* 5 ml, selanjutnya dilakukan pengeluaran serum (simpan -20 °C untuk CATT).

4.7.8 Studi toksisitas *post mortem*

Studi toksisitas *post mortem* merupakan kelanjutan pengerjaan pengamatan toksisitas *ante mortem* pada kelompok kambing sama (P-1 hingga P-5 dan K-1 hingga K-5). Dalam studi toksisitas *post mortem* dilakukan pada hati dan ginjal secara makroskopis dan histopatologi.

Pengamatan makroskopis dan histopatologi hati, ginjal

Diawali dengan *eutanasia* dengan cara penyembelihan dan segera dilakukan autopsi dengan teknik seperti tuntunan MacLeod *et al.*, (1981). Pengambilan organ hati, ginjal dilakukan secara hati-hati, dan dilakukan biopsi dengan pemilihan kriteria di bawah (Meyer, Harvey, 1992). Bila kriteria di bawah tak ditemukan maka dilakukan biopsi secara acak.

Hati dan Ginjal

1. Ditemukan bagian organ kondisi bengkak (pembesaran ukuran).
2. Ditemukan bagian organ dengan kondisi beda warna.
3. Ditemukan bagian organ dengan kondisi tekstur keras atau nodul.

Irisan ginjal harus pada bagian median, sehingga dari longitudinal akan tampak bagian kortek, medula dan pelvis renalis. Bagian irisan ginjal harus mampu meliputi sebagian kecil medula (bagian dalam medula, bagian luar medula) dan kortek. Irisan kecil organ hati dan ginjal diawetkan (formalin 10 %) dan dibuat preparat histopatologi.

4.7.9 Pengerjaan CATT

Pengerjaan CATT dilakukan berdasarkan pengerjaan Solihat *et al.*, (1996) diawali penyiapan 7 serum baik sampel, kontrol positif (*freeze-dried goat antiserum*) dan negatif (*Freeze-dried bovine serum*).

1. Serum sampel diencerkan PBS 1/4, 1/8 (di sumuran mikroplat 96 sumuran), kocok 1 menit.
2. Karton dengan 10 lingkaran, ditambahkan antigen 1 tetes, bagian akhir lingkaran digunakan sebagai kontrol positif dan kontrol negatif.

3. Dalam lingkaran ditambah serum sampel 25 μl , dan bagian akhir ditambah serum kontrol positif dan negatif 25 μl . Dilakukan homogenisasi selama ± 5 menit.
4. Dilakukan pembacaan dengan terlebih dahulu membandingkan kontrol positif dan negatif, dan ditentukan kekuatan aglutinasi.

4.8 Analisis data

Analisis data studi *in vitro* tripanosidal antara dilakukan uji komparasi menggunakan *analysis of variance*.

Analisis linieritas dilakukan melalui penilaian harga koefisien variasi dari fungsi V_{x0} (*Vervahrensstandarabweichung*) menurut Funk *et al.*, (1992).

Analisis data hasil prolehan studi antigenitas dilakukan komparasi antara kelompok perlakuan dengan kelompok kontrol menggunakan *one way analysis of variance* signifikansi 5 %.

Data pada studi perwatakan kinetik dosis tunggal, dilakukan analisis melalui bantuan kurva eksponensial. Titik koordinat yang dipilih dilakukan penghitungan persamaan fungsi eksponensial setiap fase ADME dan dilakukan analisis kuat hubungan (signifikansi 0,05). Temuan persamaan fungsi kurva dilakukan analisis nilai minimum Kriteria Akaike (Persamaan 21), dengan $N = \text{jumlah data}$ dan $p = 2n$ ($n = \text{jumlah persamaan fungsi eksponensial}$). Harga R_e dihitung melalui persamaan 22, dimana $W_i = \text{weighting factor}$, $\hat{C}-C = \text{beda kadar estimasi dan kadar observasi}$ (Yamaoka *et al.*, 1978).

Persamaan 21.

Kriteria Akaike = $N \ln R_e + 2p$

Persamaan 22.

$$R_e = \sum_{i=1}^N W_i (\hat{C} - C)^2$$

Analisis farmakogenetik data kinetik dilakukan melalui *independence t test* antar perlakuan signifikansi 5 % (Zar, 1984).

Analisis data keperluan studi perilaku laju eliminasi dilakukan secara diskriptif yaitu pencarian pola moda melalui salahsatu parameter kinetik ($T_{1/2} \beta$) individu dalam satu spesies (Saunders, Trapp, 1994). Klas moda ditentukan berdasarkan pembagian minimum klas moda (p) metode *Sturges* dimana N = jumlah sampel (persamaan 23). Penentuan interval klas ditetapkan mengikuti persamaan 24, sedangkan penentuan moda mengikuti persamaan 25. Pada persamaan 25, harga b merupakan batas bawah interval klas perkiraan frekuensi (f_i) modal, sedangkan b_1 , b_2 merupakan harga beda atas dan bawah f_i yang sering muncul (Sudjana, 1992). Nilai tengah ditentukan berdasarkan penjumlahan setengah dari dari nilai batas atas dan batas bawah interval klas.

Persamaan 23

Perkiraan jumlah klas minimum metode *Sturges* (p) = $1 + (3,3) \log N$

Persamaan 24.

Panjang interval klas = Rentang klas / Jumlah klas minimum.

Persamaan 25

$$\text{Nilai Modal } (Mo) = b + p \cdot \left(\frac{b_1}{b_1 + b_2} \right)$$

Analisis data pada studi hubungan dosis diminazen aseturat terhadap respon tripanosidal, dilakukan menggunakan cara *probit*. Dasar penentuan nilai probit dikaitkan dengan respon tripanosidal (%), merujuk pada tabel probit dan persentase respon oleh Saunders dan Flaming (1971).

Analisis data hasil pengerjaan uji tripanosidal antar kelompok dilakukan uji komparasi (*Fisher exact test*) signifikansi 0,05.

Analisis data hasil pengerjaan uji biologis antara kelompok kontrol dengan kelompok perlakuan dilakukan uji *Fisher exact test*.

Analisis data pengamatan gejala klinik dan makroskopis menggunakan *independent t test*, sedang pemeriksaan histopatologi organ antar perlakuan menggunakan *Fisher exact test* (0,05).

Data hasil perolehan waktu terkait kadar penjangaan batas terapi antar kelompok hewan coba dilakukan analisis *independent t test*.

Analisis data hasil pengerjaan uji *card aglutinasi* dilakukan uji komparasi antara sampel dengan kontrol positif menggunakan *Fisher exact test* signifikansi 0,05.

BAB 5 ANALISIS HASIL PENELITIAN

5.1 Preklinik (Tahap I)

5.1.1 Studi *in vitro* diminazen aseturat

Mengawali pengamatan hasil penelitian terlebih dahulu dilakukan pemeriksaan uji sterilitas pada media tioglikolat (komposisi dan cara pembuatan pada Lampiran 4). Hasil uji menunjukkan hingga hari ke tujuh Earle Media, stabilat parasit dan stabilat mengandung *Tripanosoma* menunjukkan tetap steril.

Hasil pemanenan tiga ekor tikus terinfeksi *T. evansi* isolat Bangkalan serta hasil penghitungan jumlah parasit *Tripanosoma/ml* darah dan stabilat, mendapatkan jumlah cukup (Tabel 5.1). Stok parasit yang terkumpul dilakukan pengaturan agar setiap pemberian 50 μ l media mengandung 3×10^2 Trip/sumuran (Lampiran 6.2).

Tabel 5.1. Jumlah parasit/ml hasil pemanenan tikus tertular

No. Tikus	Parasitemia (++++)	Perolehan dari tubuh		Perolehan pasca pemisahan	
		Darah (ml)	Trip/ml darah	Stabilat (ml)	Stabilat (Trip/ml)
Tikus 1	5 hari	4,4	8×10^5	9,0	5×10^5
Tikus 2	6 hari	4,3	6×10^5	9,5	3×10^5
Tikus 3	6 hari	4,0	4×10^5	9,5	2×10^5
JUMLAH		12,7	18×10^5	28,0	1×10^6

Hasil penimbangan secara seksama diminazen aseturat baku keperluan pembuatan stok ke satu diperoleh 10 mg sedangkan

untuk keperluan pembuatan stok ke dua diperoleh 16,5 mg. Bila keduanya dilarutkan dalam media parasit 100 ml maka stok ke satu akan diperoleh 100 µg/ml dan stok ke dua 165 µg/ml. Pada stok ke satu diambil 9 ml dan ditambahkan media parasit sampai dengan 10 ml maka stok ke satu akan mendapatkan kadar 90 µg/ml. Bila stok ke dua diambil 1,8 ml dan ditambahkan media parasit sampai dengan 10 ml, maka akan mendapatkan kadar 29,7 µg/ml.

Hasil pengamatan sumuran mikropelat lebih lanjut pada ke dua stok perlakuan dan kontrol adalah seperti tampak pada Tabel 5.2.

Tabel 5.2. Rentang kadar tripanosidal diminazen aseturat

Dim. ast I (µg/ml)	HASIL Dim. ast I			Dim. ast II (µg/ml)	HASIL Dim. ast II			KONTROL (Plasebo)		
90,000	-	-	-	29,700	-	-	-	+	+	+
30,000	-	-	-	9,900	-	-	-	+	+	+
10,000	-	-	-	3,300	+	+	+	+	+	+
3,330	+	+	+	1,100	+	+	+	+	+	+
1,110	+	+	+	0,370	+	+	+	+	+	+
0,370	+	+	+	0,120	+	+	+	+	+	+
0,111	+	+	+	0,090	+	+	+	+	+	+

+ : Ditemukan parasit

- : Tak ditemukan parasit

Hasil pencarian rentang kadar tripanosidal diminazen aseturat menunjukkan perkiraan rentang pada 3 ppm -10 ppm, dan pencarian kadar lebih lanjut adalah antara rentang 3 ppm - 12 ppm. Hasil penimbangan diminazen aseturat diperoleh 10,577 mg dan bila dilarutkan dalam 100 ml media parasit akan diperoleh kadar stok 105,77 µg/ml. Dengan demikian serial yang disediakan 3,52 µg/ml, 4,24 µg/ml, 5,3 µg/ml, 6,36 µg/ml, 7,42 µg/ml, 8,48 µg/ml,

9,54 $\mu\text{g/ml}$, 10,577 $\mu\text{g/ml}$, 12, 72 $\mu\text{g/ml}$, 31, 73 $\mu\text{g/ml}$. Hasil penelitian menunjukkan kadar diminazen aseturat 8,48 $\mu\text{g/ml}$ mulai menghasilkan daya tripanosidal (Tabel 5.3).

Tabel 5.3. Kadar tripanosidal diminazen aseturat

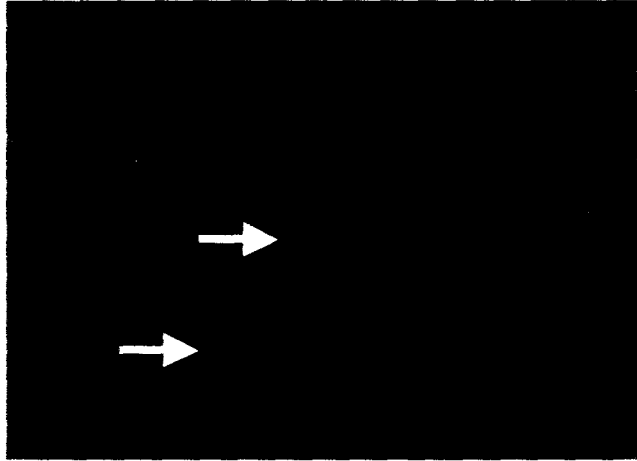
Dim. ast ($\mu\text{g/ml}$)	HASIL Dim. ast.			Suramin ($\mu\text{g/ml}$)	KONTROL (+) Suramin			KONTROL (-) (Plasebo)		
	- ^a	- ^a	- ^a		- ^b	- ^b	- ^b	+ ^c	+ ^c	+ ^c
31,730	- ^a	- ^a	- ^a	9,900	- ^b	- ^b	- ^b	+ ^c	+ ^c	+ ^c
12,720	- ^a	- ^a	- ^a	6,600	- ^b	- ^b	- ^b	+ ^c	+ ^c	+ ^c
10,577	- ^a	- ^a	- ^a	3,300	+ ^b	+ ^b	+ ^b	+ ^c	+ ^c	+ ^c
9,540	- ^a	- ^a	- ^a	1,100	+ ^b	+ ^b	+ ^b	+ ^c	+ ^c	+ ^c
8,480	- ^a	- ^a	+ ^a	0,370	+ ^b	+ ^b	+ ^b	+ ^c	+ ^c	+ ^c
7,420	- ^a	+ ^a	+ ^a	0,120	+ ^b	+ ^b	+ ^b	+ ^c	+ ^c	+ ^c
6,360	- ^a	+ ^a	+ ^a	0,090	+ ^b	+ ^b	+ ^b	+ ^c	+ ^c	+ ^c
5,300	+ ^a	+ ^a	+ ^a	0,030	+ ^b	+ ^b	+ ^b	+ ^c	+ ^c	+ ^c
4,240	+ ^a	+ ^a	+ ^a	0,020	+ ^b	+ ^b	+ ^b	+ ^c	+ ^c	+ ^c
3,530	+ ^a	+ ^a	+ ^a	0,010	+ ^b	+ ^b	+ ^b	+ ^c	+ ^c	+ ^c

+ : Ditemukan parasit

- : Tak ditemukan parasit

Superskrip berbeda pada lajur sama, berbeda nyata $p < 0,05$
(Lampiran 7.1 dan 7.2)

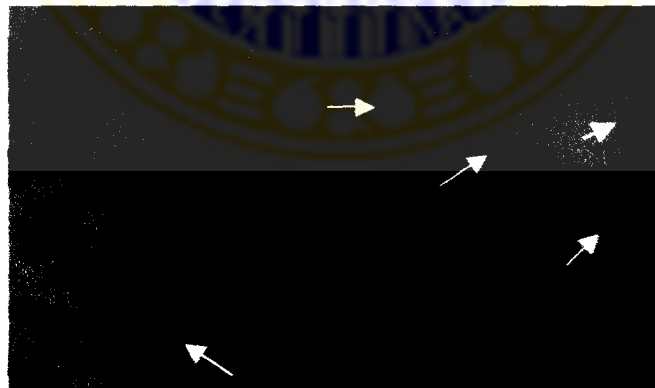
Gambar 5.1a tampak masih dapat ditemui parasit pada satu lapang pandang hasil cuplikan dari satu sumuran mikroplat pemberian diminazen aseturat 8,84 $\mu\text{g/ml}$. Keadaan parasit dalam Gambar 5.1a mengapung ke atas. Dalam Gambar 5.1b hasil cuplikan dari satu sumuran mikroplat pemberian suramin 9,9 $\mu\text{g/ml}$ tampak tidak ditemui parasit dalam satu lapang pandang. Gambar 5.1c adalah kontrol positif dari cuplikan satu sumuran mikroplat dengan banyak ditemuinya parasit dalam satu lapang pandang.



Gambar 5.1a Pemberian kadar 8,48 $\mu\text{g/ml}$ diminazen aseturat pada *T. evansi* isolat Bangkalan (natif, 400x)



Gambar 5.1b. Pemberian kadar 6,60 $\mu\text{g/ml}$ suramin pada *T. evansi* isolat Bangkalan (natif, 400x)



Gambar 5.1c. Kontrol (-) dengan adanya *T. evansi* isolat Bangkalan pada sumuran mikroplat (natif, 400x)

5.1.2 Uji antigenitas

Hasil uji antigenitas pada kelompok subyek perlakuan menunjukkan dalam tindakan penularan sebanyak dua kali dalam satu hari akan mempercepat terjadinya parasitemia. Hari pertama hingga hari ke lima masa penularan, belum ditemukan parasit pada aliran darah kelompok kambing perlakuan. Hari ke enam masa penularan mulai ditemukan kondisi parasitemia positif satu dari salah satu kambing perlakuan. Hari ke tujuh masa penularan seluruh kelompok kambing perlakuan menderita parasitemia. Pada tujuh hari masa penularan kondisi parasitemia kambing telah memasuki kondisi parasitemia positif dua. Pengamatan pada kelompok kontrol menunjukkan tak ditemukan kondisi parasitemia hingga hari ke tujuh.

Jumlah dosis penularan tripanosoma yang telah diberikan menunjukkan hingga hari ke lima setiap individu rerata menerima $21,45 \cdot 10^6$ Trip/ml. Pada hari ke enam akumulasi dosis penularan telah mencapai rerata $2,78 \cdot 10^6$ Trip/ml. Kemunculan parasit pada sirkulasi darah perifer (hari ke tujuh) akan tampak pada pemberian akumulasi dosis penularan rerata $28,68 \cdot 10^6$ Trip/ml. Pada hari ke tujuh kondisi parasitemia ke tiga kambing perlakuan berlangsung bersamaan (parasitemia ++).

Lebih lanjut hasil uji antigenitas *T. evansi* isolat Bangkalan terhadap ke tiga ekor kambing peranakan Etawa, tampak pada Tabel 5.4 dan Tabel 5.5.

Tabel 5.4 Stok dosis penularan dan perkembangan parasitemia

Hari	Perlakuan kambing-1 (23 kg) Hb : 10,30 g %				Perlakuan kambing-2 (31 kg) Hb: 12,10 g %				Perlakuan kambing-3 (30 kg) Hb 11,50 g %				Kontrol (Hb g%)		
	Stok Pagi	Stok Sore	Dosis trip/ml		Stok Pagi	Stok Sore	Dosis trip/ml		Stok Pagi	Stok Sore	Dosis trip/ml		4 10,5 0	5 11,00	6 11,50
			Parasitemia				Parasitemia				Parasitemia				
1	6.10 ⁵ Trip/ml	8.10 ⁵ Trip/ml	(Pagi) 3.10 ⁵	(Sore) 5.10 ⁴	7.10 ⁷ Trip/ml	8.10 ⁵ Trip/ml	(Pagi) 5.10 ⁵	(Sore) 5.10 ⁵	20.10 ⁶ Trip/ml	18.10 ⁵ Trip/ml	(Pagi) 8.10 ⁵	(Sore) 9.10 ⁵	- ^b	- ^b	- ^b
			- ^a				- ^a				- ^a				
2	6.10 ⁵ Trip/ml	9.10 ⁵ Trip/ml	(Pagi) 5.10 ⁵	(Sore) 7.10 ⁵	9.10 ⁵ Trip/ml	6.10 ⁵ Trip/ml	(Pagi) 6.10 ⁵	(Sore) 6.10 ⁵	8.10 ⁶ Trip/ml	9.10 ⁶ Trip/ml	(Pagi) 6.10 ⁵	(Sore) 5.10 ⁵	- ^b	- ^b	- ^b
			- ^a				- ^a				- ^a				
3	8.10 ⁵ Trip/ml	6.10 ⁵ Trip/ml	(Pagi) 5.10 ⁵	(Sore) 6.10 ⁵	12.10 ⁵ Trip/ml	11.10 ⁵ Trip/ml	(Pagi) 1.10 ⁶	(Sore) 6.10 ⁵	7.10 ⁶ Trip/ml	6.10 ⁶ Trip/ml	(Pagi) 5.10 ⁵	(Sore) 6.10 ⁵	- ^b	- ^b	- ^b
			- ^a				- ^a				- ^a				
4	5.10 ⁵ Trip/ml	8.10 ⁵ Trip/ml	(Pagi) 5.10 ⁵	(Sore) 5.10 ⁵	15.10 ⁷ Trip/ml	6.10 ⁷ Trip/ml	(Pagi) 8.10 ⁶	(Sore) 7.10 ⁶	9.10 ⁶ Trip/ml	8.10 ⁵ Trip/ml	(Pagi) 8.10 ⁵	(Sore) 5.10 ⁵	- ^b	- ^b	- ^b
			- ^a				- ^a				- ^a				
5	7.10 ⁵ Trip/ml	8.10 ⁵ Trip/ml	(Pagi) 5.10 ⁵	(Sore) 6.10 ⁵	13.10 ⁷ Trip/ml	18.10 ⁵ Trip/ml	(Pagi) 12.10 ⁵	(Sore) 8.10 ⁵	12.10 ⁶ Trip/ml	7.10 ⁶ Trip/ml	(Pagi) 6.10 ⁵	(Sore) 6.10 ⁵	- ^b	- ^b	- ^b
			- ^a				- ^a				- ^a				
6	8.10 ⁵ Trip/ml	7.10 ⁵ Trip/ml	(Pagi) 6.10 ⁵	(Sore) 5.10 ⁵	2.10 ⁵ Trip/ml	23.10 ⁷ Trip/ml	(Pagi) 12.10 ⁵	(Sore) 8.10 ⁵	8.10 ⁶ Trip/ml	12.10 ⁶ Trip/ml	(Pagi) 8.10 ⁵	(Sore) 7.10 ⁵	- ^b	- ^b	- ^b
			+ ^a				- ^a				+ ^a				
7	18.10 ⁵ Trip/ml	20.10 ⁷ Trip/ml Hb 10,00 g%	(Pagi) 6.10 ⁵	(Sore) 6.10 ⁶	25.10 ⁷ Trip/ml	2.10 ⁵ Trip/ml Hb 9,00 g%	(Pagi) 18.10 ⁵	(Sore) 2.10 ⁵	12.10 ⁵ Trip/ml	8.10 ⁶ Trip/ml Hb 9,50 g%	(Pagi) 7.10 ⁵	(Sore) 6.10 ⁵	- ^b 11	- ^b 11,2	- ^b 12
			++ ^a				++ ^a				++ ^a				

- : Belum ditemukan parasit pada pemeriksaan WBF

+ : Telah ditemukan parasit pada pemeriksaan WBF

Huruf superskrip yang berbeda pada lajur sama, berbeda nyata ($p < 0,05$, Lampiran 8)

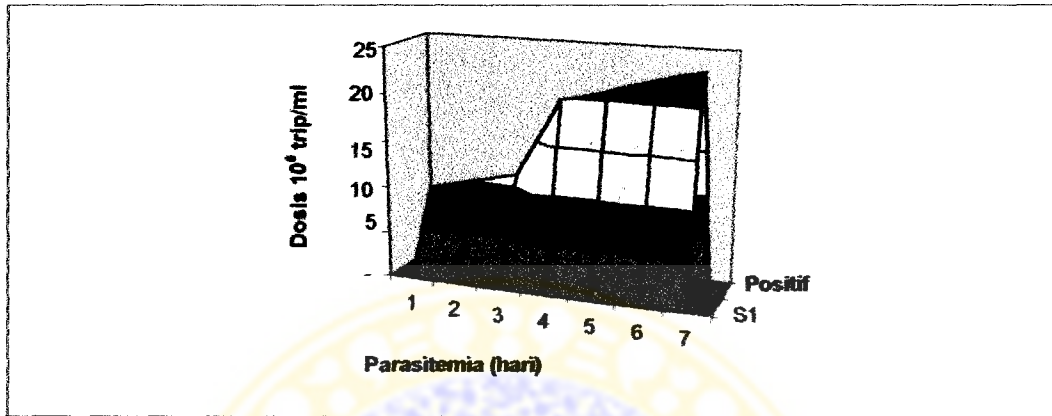
Tabel 5.5 Dosis kumulatif tripanosoma penimbul parasitemia kambing perlakuan

Hari	Perlakuan kambing-1		Perlakuan kambing-2		Perlakuan kambing-3		RERATA Dosis.10 ⁶ (Trip/ml)
	Dosis kumulati (10 ⁶) Trip/ml	Parasitemia	Dosis kumulatif (10 ⁶) Trip/ml	Parasitemia	Dosis kumulatif (10 ⁶) Trip/ml	Parasitemia	
1	3,05	-	1,00	-	8,90	-	4,32
2	4,25	-	7,60	-	10,00	-	7,28
3	15,25	-	9,20	-	11,10	-	11,85
4	16,25	-	24,20	-	19,60	-	20,02
5	17,35	-	26,20	-	20,80	-	21,45
6	23,85	+	28,20	-	22,30	+	24,78
7	30,45	++	32,00	++	23,60	++	28,68

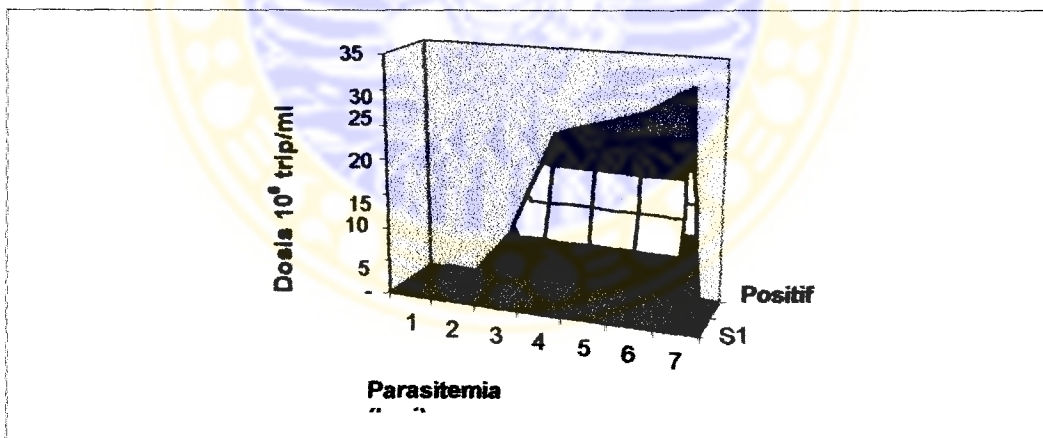
- : Belum ditemui kondisi parasitemia pada pemeriksaan ulas darah tebal

+ : Ditemui kondisi parasitemia pada pemeriksaan WBF

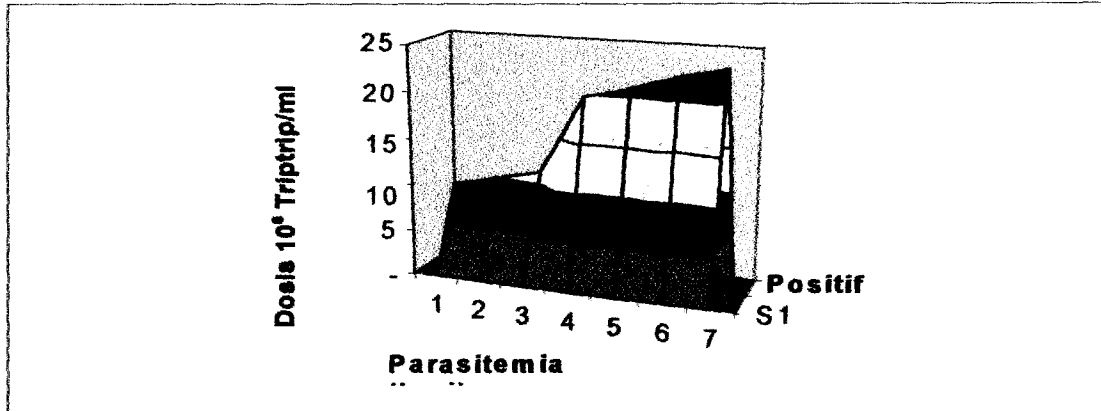
Gambaran hasil hubungan antara waktu timbulnya parasitemia dengan jumlah dosis parasit yang ditularkan tampak pada Gambar 5.2a, Gambar 5.2b dan Gambar 5.2c.



Gambar 5.2a. Hubungan waktu timbulnya parasit dengan Jumlah dosis penularan pada kambing perlakuan (Kambing perlakuan-1)



Gambar 5.2b. Hubungan waktu timbulnya parasit dengan Jumlah dosis penularan pada kambing perlakuan (Kambing perlakuan-2)



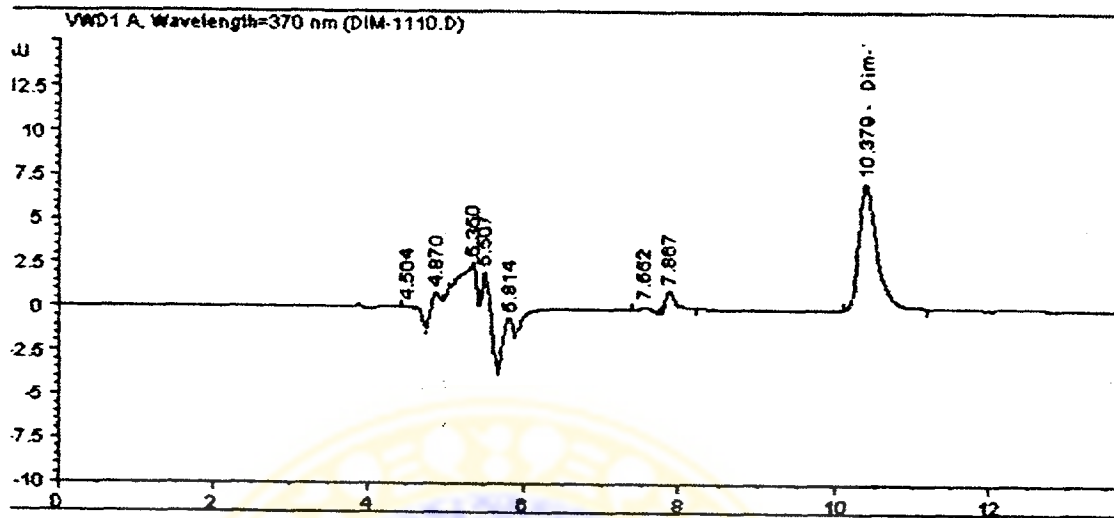
Gambar 5.2c. Hubungan waktu timbulnya parasit dengan Jumlah dosis penularan pada kambing perlakuan (Kambing perlakuan-3)

5.1.3 Optimasi dan validasi KCKT

Pengerjaan optimasi didapatkan hasil kondisi pilihan kerja dilakukan menggunakan cara isokratis. Sedangkan fraksi eluen fase mobil yang dipilih adalah Asetonitril : Air 30 % : 70 % mengandung 0,005 M 1-octanosulphonic acid sod. salt dan 0,1 % Trietilamin pada tingkat pH 5,5. Panjang gelombang detektor ditetapkan pada 370 nm, dengan pertimbangan merupakan panjang gelombang maksimum diminazen aseturat dalam air. Pada Lampiran 5 diketahui hasil pengamatan panjang gelombang maksimum diminazen aseturat dalam air, ditemui dua puncak panjang gelombang maksimum. Dari dua puncak tersebut diketahui absorban tertinggi ditemui pada panjang gelombang 370 nm.

Dengan pilihan jenis kolom Oktadesil silan (C18) 4,6x250 mm (\varnothing 5 μ m), suhu ruang kolom 28 °C nm serta kecepatan alir eluen fase mobil diatur pada 0,5 ml/menit, sehingga waktu tambat analit akan muncul pada \pm 10,379 menit (Gambar 5.9).

MILIK
PERPUSTAKAAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA



Gambar 5.3. Kromatogram diminazen aseturat (2,6 µg/ml dalam air) dengan waktu tambat 10,379 menit, pada eluen fase mobil (pH 5,5) asetonitril : air (30:70) mengandung 0,005 M 1-octanosulphonic acid sod. salt, 0,1 % Trietilamin.

Perolehan kromatogram analit dalam kondisi, di bagian depan dan bagian akhir tak ditemui bentukan kromatogram pengganggu. Dengan demikian kondisi optimasi yang dipilih dalam pengerjaan kualitatif penentuan diminazen aseturat menggunakan KCKT cukup selektif untuk digunakan.

Lebih lanjut hubungan antara seri kadar diminazen aseturat dalam air dengan area kromatogram hasil pembacaan integrator tampak pada Tabel 5.6. Hasil analisis liniaritas menunjukkan harga koefisien variasi dari fungsi $Y = 1,431 + 48,619 X$ kurang dari 2 %.

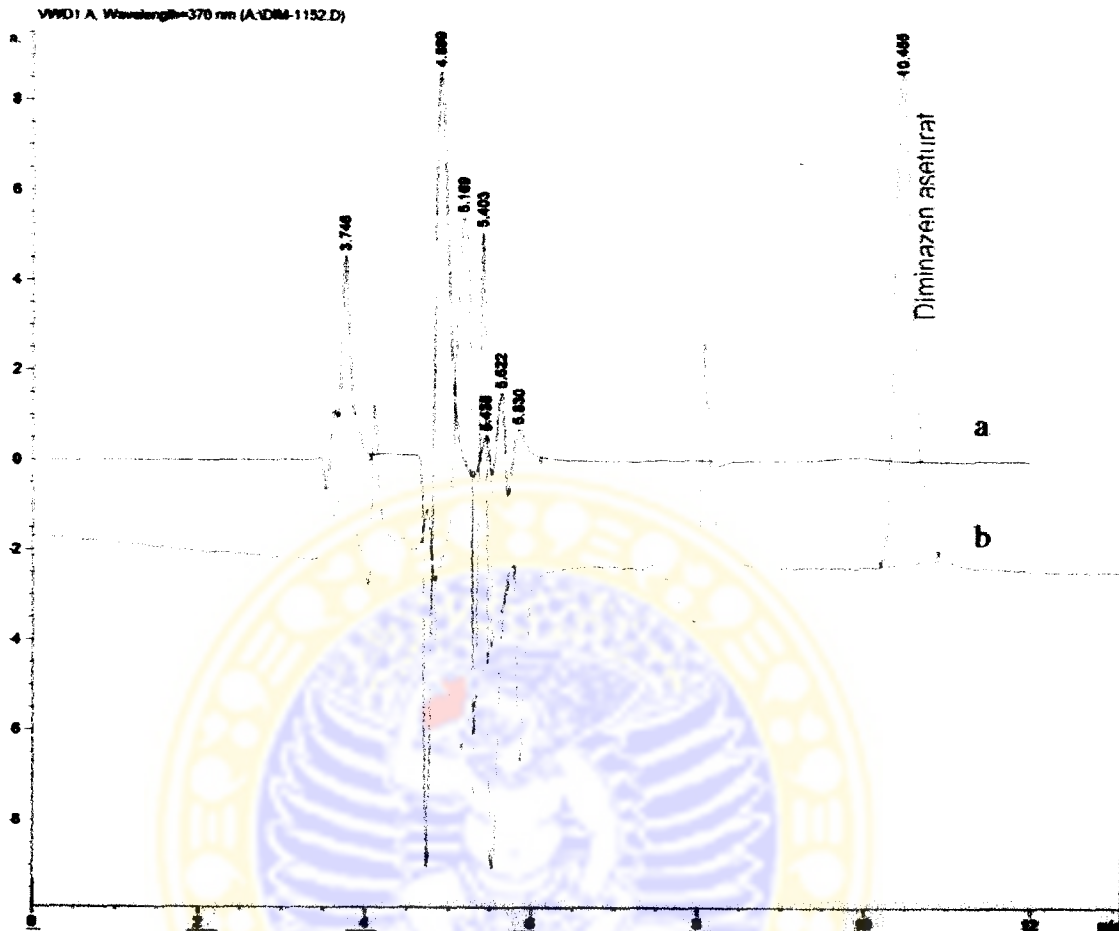
Tabel 5.6 Hubungan kadar analit dalam air dan area kromatogram

No.	Kadar ($\mu\text{g/ml}$)	Area (mAU)
1	0,132	8,32535
2	0,218	11,54595
3	0,570	28,66204
4	0,620	31,34878
5	1,290	64,14847
6	1,740	86,60482
7	2,380	118,07094
8	3,500	170,81313

Jumlah data : Delapan
 Persamaan garis : $Y = 1,431198 + 48,61913 X$
 Kofesien korelasi : 0,9999445
 Harga Sy : 0,6520886
 Harga V_{x0} : 1,02677 %
 Harga X_p : 5,925339E-02

Korelasi baik, r hitung $>$ r tabel untuk $p < 0,05$
 Variasi MEMENUHI SYARAT, $V_{x0} \leq 2 \%$
 Harga X_p baik, $X_p < 0,132$

Pada awal pengerjaan validasi diperoleh hasil preparasi analit menggunakan cara Gummow (1993) menunjukkan di daerah kemunculan kromatogram analit dalam plasma (10-11 menit) tak ditemui kromatogram pengganggu. Namun di daerah $< 8-9$ menit nampak beberapa kromatogram pengganggu muncul. Bila dilakukan *overlay* kromatogram analit dalam plasma dengan kromatogram plasma blanko, maka puncak analit dengan mudah teridentifikasi. Keadaan tersebut dengan mudah di dapat bila pH eluen fase mobil 5,5, pergeseran pH ke atas akan menyebabkan pengunduran waktu tambat analit. Lebih lanjut gambaran kromatogram analit dalam plasma buatan dapat diikuti pada Gambar 5.4.



Gambar 5.4. Kromatogram (a) plasma blanko dan (b) diminazen aseturat 1 µg/ml dalam plasma (waktuambat 10,455 menit) pada λ 370 nm dengan eluen fase mobil asetonitril : air (30:70) 0,005 M 1-octanosulphonic acid sod. salt., 0,1 % Trietilamin, pH 5,5.

Analisis hasil parameter penentuan harga perolehan kembali (% *recovery*) dan presisi dalam satu hari (*intraday precision*) setiap kadar pada lima replikat seperti tampak pada Tabel 5.7. Rerata harga perolehan kembali (akurasi) pada empat serial 0,26 µg/ml, 0,475 µg/ml, 1,086 µg/ml, 2,32 µg/ml adalah $86,79 \pm 0,988 \%$ dengan koefisien variasi presisi $3,739 \pm 0,831 \%$.

Tabel 5.7. Harga recovery dan koefisien variasi serial kadar diminazen aseturat dalam plasma

Kadar ($\mu\text{g/ml}$)	Replikat (n)	Perolehan kadar		Akurasi	
		Kadar ($\mu\text{g/ml}$)	Rerata ($\mu\text{g/ml}$)	Recovery (%)	Rerata
Kadar 0,26 ($\mu\text{g/ml}$)	1	0,222	0,225 \pm 0,01	85,38	86,690 \pm 4,202
	2	0,229			
	3	0,224			
	4	0,211			
	5	0,241			
	Koefisien Variasi Presisi (%)				4,847
Kadar 0,475 ($\mu\text{g/ml}$)	1	0,391	0,408 \pm 0,013	82,42	85,874 \pm 2,672
	2	0,415			
	3	0,417			
	4	0,397			
	5	0,419			
	Koefisien Variasi Presisi (%)				3,111
Kadar 1,086 ($\mu\text{g/ml}$)	1	0,966	0,938 \pm 0,036	88,97	86,408 \pm 3,306
	2	0,883			
	3	0,965			
	4	0,956			
	5	0,921			
	Koefisien Variasi Presisi (%)				3,826
Kadar 2,32 ($\mu\text{g/ml}$)	1	2,091	2,046 \pm 0,063	90,13	88,178 \pm 2,712
	2	2,047			
	3	2,088			
	4	2,065			
	5	1,938			
	Koefisien Variasi Presisi (%)				3,075

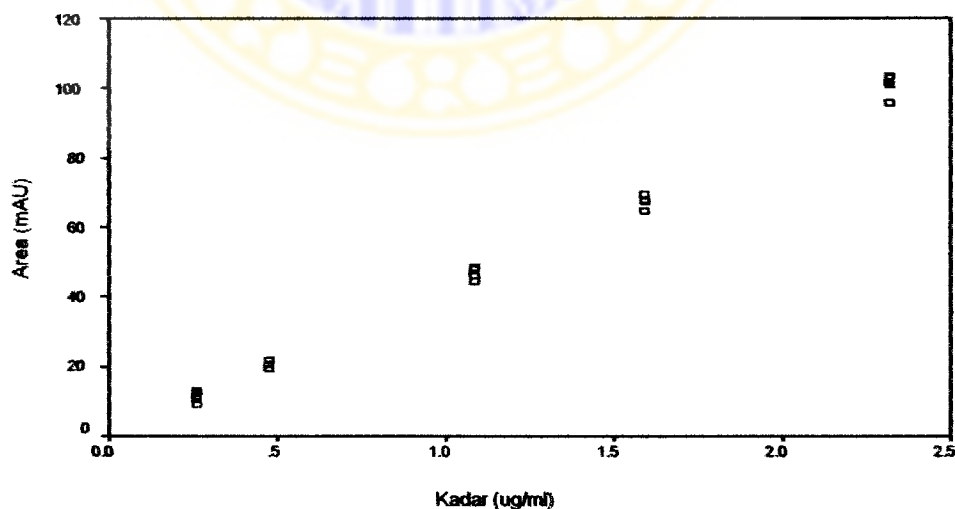
Hasil pengerjaan kadar diminazen aseturat 1,59 $\mu\text{g/ml}$ dalam plasma menghasilkan rerata harga perolehan kembali lima replikat 85, 500 \pm 2,16 % dengan koefisien variasi 2,527 %. Secara keseluruhan analisis serial kadar diminazen aseturat dalam plasma buatan rentang 0,26 $\mu\text{g/ml}$, 0,475 $\mu\text{g/ml}$, 1,086 $\mu\text{g/ml}$, 1,59 $\mu\text{g/ml}$, 2,32 $\mu\text{g/ml}$ menghasilkan rerata harga perolehan kembali 86,53 \pm 2,974 % dengan koefisien variasi (KV) 3,437 %. Lebih lanjut analisis serial lima kadar diminazen aseturat dalam plasma buatan seperti tampak pada Tabel 5.8.

Tabel 5.8 Hubungan rerata kadar diminazen aseturat dalam plasma dengan rerata area kromatogram

Replikat	Kadar 0,26 µg/ml	Kadar 0,475 ug/ml	Kadar 1.086 ug/ml	Kadar 1.59 µg/ml	Kadar 2,32 µg/ml
	Area (mAU)	Area (mAU)	Area (mAU)	Area (mAU)	Area (mAU)
1.	12,21241	20,46596	48,40562	67,52071	103,45118
2.	12,56922	21,62195	44,37343	67,88645	100,93573
3.	12,33102	21,72403	48,36603	68,01363	102,94411
4.	11,69825	20,72845	47,91903	69,39151	101,84952
5.	13,13750	21,80177	46,23552	64,81992	95,67941
Rerata	12,38968 ± 0,525 (%KV = 4,241)	21,26843 ± 0,623 (%KV = 2,929)	47,05993 ± 1,74 3 (%KV = 3,704)	67,52644±1,671 (%KV = 2,475)	100,97199 ± 3,115 (%KV = 3,085)

Jumlah data kadar dan rerata area : Lima
 Persamaan garis : $Y=0,806 + 42,783 X$
 Koefesien korelasi : 0,997
 Harga S_y : 0,967
 Harga V_{x0} : 1,971 %
 Harga X_p : 0,135
 Korelasi baik, r hitung > r table untuk $p < 0,05$
 Variasi MEMENUHI SYARAT, $V_{x0} \leq 2 \%$
 Harga X_p BAIK, $X_p < 0,26$

Sedangkan gambar hubungan rerata kadar analit dalam plasma dengan rerata area kromatogram , tampak pada Gambar 5.5.



Gambar 5.5. Liniaritas kadar dan rerata area analit dalam plasma

Pengerjaan batas deteksi dan batas kuantifikasi diperoleh hasil kadar terkecil diminazen aseturat dalam air tanpa memunculkan area kromatogram 0,0004 $\mu\text{g/ml}$. Dilakukan pencatatan serial lima kadar di atas kadar 0,0004 ug/ml (memunculkan area kromatogram) keperluan kurva kadar terhadap area. Serial tersebut 0,00100 ug/ml (1,71730 mAU), 0,00114 ug/ml (2,26576 mAU), 0,00174 ug/ml (2,65674 mAU), 0,00230 ug/ml (3,19341 mAU), 0,00234 ug/ml (3,26106). Dengan demikian harga batas deteksi 0,0011 $\mu\text{g/ml}$, batas kuantifikasi 0,0032 ug/ml .

5.1.4 Perwatakan kinetik dosis tunggal

Pemeriksaan kimia klinik fungsi hati (SGPT,SGOT) dan fungsi ginjal (Kreatinin, BUN) praperlakuan terhadap kelompok sehat dan tertular menunjukkan masih dalam rentang sehat. Lebih lanjut hasil pemeriksaan kimia klinik tampak pada Tabel 5.9.

Pemeriksaan beberapa bagian kimia klinik fungsi hati dan ginjal pada kelompok kambing praperlakuan menghasilkan harga koefisien variasi (KV) SGPT 45, 78 %, SGOT 37,98 %, Kreatinin 40,40 %, BUN 32,90 %.

Hasil analisis perwatakan kinetik dosis tunggal pada subyek sehat maupun tertular menunjukkan dipelajari menggunakan model kompartemental (dua kompartemen).

Tabel 5.9. Harga SGPT, SGOT, KREATININ, BUN, Hb praperlakuan studi kinetik diminazen aseturat dosis tunggal

Subyek	SGPT (U/L)	SGOT (U/L)	Kreatinin (mg/dl)	BUN (mg/dl)	Tempat Pemeriksaan	Hb (g%)
K-1	30,0	99,0	1,70	23,40	RS.Dr.Soetomo	11,20
K-2	33,0	81,0	1,40	25,20	RS.Dr.Soetomo	13,20
K-3	48,0	174,0	1,40	25,70	RS.Dr.Soetomo	14,00
K-4	11,0	36,0	0,70	30,57	RS.Dr.Soetomo	12,00
K-5	32,0	93,0	0,90	16,60	RS.Dr.Soetomo	11,50
K-6	13,0	76,0	0,75	29,90	RS.Dr.Soetomo	11,50
K-7	13,0	97,0	1,05	23,30	RS.Dr.Soetomo	12,50
K-8	21,0	79,0	0,43	34,70	RS.Dr.Soetomo	13,00
K-9	25,0	81,0	0,95	14,10	RS.Dr.Soetomo	12,50
K-10	23,0	87,0	0,65	10,40	RS.Dr.Soetomo	11,50
Rerata	24,9±11,4	90,3±34,3	0,99±0,4	23,4±7,7	† Blood et al., (1986)	12,30 ± 0,91
Normal	S/d 50	s/d 307±43‡	s/d 2,7†	8-35‡	‡ Duncan, Prass (1986)	8-15*
					* Merck Vet. Manual (2003)	

Hasil analisis parameter kinetika pola ADME diminazen aseturat ekstra vaskular setiap individu menggunakan cara *feathering (back projection)*, cocok digunakan persamaan tri-eksponensial ($C_p = M \cdot e^{-\beta t} + L \cdot e^{-\alpha t} - N \cdot e^{-\gamma t}$). Pada analisis beda perolehan (Δ) antara kadar observasi (C_p) terhadap kadar estimasi (\hat{C}) ADME fungsi tri-eksponensial individu menghasilkan Kriteria Akaike (*Akaike's Criterion/AIC*) terkecil rerata $77.36 \pm 20,61$. Asumsi pilihan pada analisis nilai Kriteria Akaike adalah faktor pembobotan (*weghting factor*) dinyatakan bernilai satu. Nilai tersebut mengandung makna terkait dengan hasil pengerjaan % perolehan kembali yaitu pada kadar besar mendapatkan hasil lebih mendekati harga observasi dibandingkan kadar kecil (Yamaoka et al., 1978). Dalam studi tersebut diketahui rerata harga perolehan kembali kadar 2,32 ug/ml, di dapat 88,178 % dengan nilai koefisien variasi 3,075 %, sedangkan rerata harga perolehan kembali kadar 0,26 ug/ml di

dapat hanya 86,690 % dengan nilai Koefisien Variasi 4,204 %. Perbandingan harga perolehan kembali antara kadar besar dan kadar kecil, memiliki harga relatif lebih tinggi pada kadar besar dengan nilai Koefisien Variasi lebih kecil. Secara rinci hasil penghitungan parameter kinetika dosis tunggal tampak pada Tabel 5.10 (Kelompok tertular) dan Tabel 5.11 (kelompok kontrol). Lebih lanjut hasil penghitungan parameter kinetik dan rajah grafik semilog dapat diikuti pada Lampiran 9 – 18.

Secara kumulatif hasil rajah grafik semilog antara kadar terhadap waktu kinetik dosis tunggal kambing perlakuan tampak pada Gambar 5.6 (Lampiran 19) dan Gambar 5.7 (Lampiran 20).

Hasil analisis uji perbedaan parameter kinetik antar kelompok menunjukkan tak semua nilai parameter kinetik antar perlakuan seragam (Lampiran 21.1 hingga Lampiran 21.8).

Analisis variabilitas kinetik melalui pelacakan parameter kinetik α , $T_{1/2\beta}$, T_{maks} , V_d antar perlakuan dalam satu spesies (K6-K10 dan K1-K5), menunjukkan tak terdapat kemaknaan ($p > 0,05$).

Parameter kinetik K_a , C_{maks} , AUC dan Cl secara signifikan memiliki perbedaan variabilitas secara bermakna (kelompok perlakuan dibandingkan kelompok kontrol, pada $p < 0,05$).

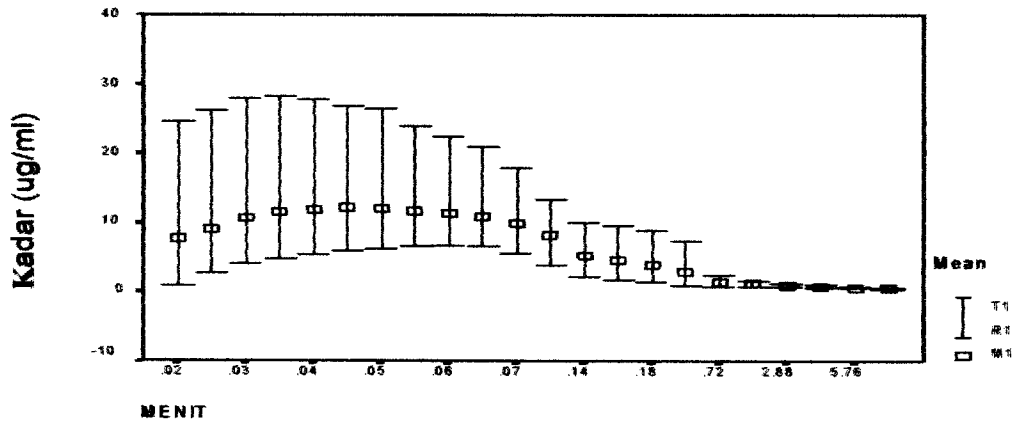
Analisis variabilitas parameter kinetik lebih rinci tampak pada Tabel 5.12 sedang hasil analisis uji perbedaan *t independent* antar perlakuan tampak pada Lampiran 21.1 hingga Lampiran 21.8.

Tabel 5.11. Parameter kinetik diminazen aseturat dosis tunggal pada kambing sehat

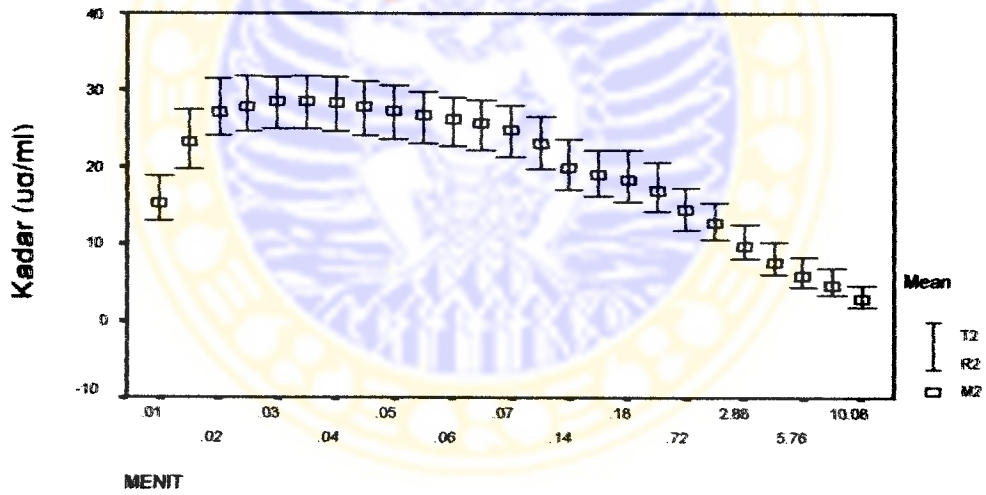
Parameter	K-1	K-2	K-3	K-4	K-5	Rerata
Berat badan (kg)	21,0	20,0	21,0	22,0	27,5	22,3 ± 2,992
ABSORBSI						
Ka (menit ⁻¹)	0,086	0,151	0,164	0,152	0,078	0,126 ± 0,04
N (µg/ml)	43,937	27,649	29,992	40,046	34,120	35,149 ± 6,803
DISTRIBUSI						
α (menit ⁻¹)	0,013	0,009	0,010	0,012	0,010	0,011 ± 0,002
K12 (menit ⁻¹)	0,008	0,003	0,005	0,007	0,004	0,005 ± 0,002
K21 (menit ⁻¹)	0,005	0,006	0,004	0,004	0,005	0,005 ± 0,001
L (µg/ml)	30,060	8,829	16,667	24,131	16,891	19,316 ± 8,085
Tmaks (menit)	31,050	27,500	21,970	21,750	37,509	27,956 ± 6,622
Cmaks (µg/ml)	32,010	25,010	26,010	32,010	31,866	29,381 ± 3,552
Vds (L)	3,100	4,800	4,710	3,800	5,000	4,282 ± 0,806
ELIMINASI						
β (menit ⁻¹)	0,200.10 ⁻³	0,100.10 ⁻³	0,100.10 ⁻³	0,200.10 ⁻³	0,200.10 ⁻³	0,0,160.10 ⁻³ ± 0,055.10 ⁻³
M (µg/ml)	15,288	18,715	13,036	14,811	20,021	16,374 ± 2,896
K13 (menit ⁻¹)	1,000.10 ⁻³	0,200.10 ⁻³	0,300.10 ⁻³	0,500.10 ⁻³	0,400.10 ⁻³	4,8.10 ⁻³ ± 3,000.10 ⁻³
Cl (ml/menit)	1,845	1,003	1,510	2,070	1,800	1,646 ± 0,411
T1/2 β (Jam ⁻¹)	82,500	82,500	82,500	55,000	57,750	72,050 ± 14,342
AUC ^{0-∞} (µg/ml.menit)	75772,760	132787,488	92569,538	70717,449	102241,746	94817,796 ± 24725,530

Dosis 7 mg /kg berat badan (intramuskular)

Fraksi obat terabsorbsi = 95,1 % (Aliu, Ødegaard 1985).



Gambar 5.6. Profil farmakokinetik diminazene aseturat pemberian 7 mg/kg berat badan intramuskular pada kambing jantan Peranakan Etawa (PE) penderita Tripanosomiasis.



Gambar 5.7. Profil farmakokinetik diminazene aseturat pemberian 7 mg/kg berat badan intramuskular pada kambing jantan peranakan Etawa (PE).

Tabel 5.14. Studi hubungan dosis dan respon tripanosidal pada kambing jantan Peranakan Etawa (PE)

Kode	Hari I			Hari II			Hari III		
	Dosis Trip/ml	Suhu rektal	Ulas darah	Dosis Trip/ml	Suhu rektal	Ulas darah	Dosis Trip/ml	Suhu Rektal	Ulas darah
Ka-DR1	11,9.10 ⁷	38,7	-	30.10 ⁷	40,6	-	37.10 ⁷	40,7	-
Kb-DR1	11,9.10 ⁷	39,0	-	30.10 ⁷	40,6	-	37.10 ⁷	40,9	-
Kc-DR1	11,9.10 ⁷	38,5	-	30.10 ⁷	40,5	-	37.10 ⁷	40,8	-
Kf-DR2	15,0.10 ⁷	39,0	-	40.10 ⁷	39,0	-	40.10 ⁷	40,0	-
Kg-DR2	15,0.10 ⁷	38,7	-	40.10 ⁷	39,0	-	40.10 ⁷	40,0	-
Kh-DR2	15,0.10 ⁷	38,6	-	40.10 ⁷	38,8	-	40.10 ⁷	40,1	-
Ki-DR3	18,0.10 ⁷	38,0	-	30.10 ⁷	39,0	-	30.10 ⁷	40,5	-
Kj-DR3	18,0.10 ⁷	38,4	-	30.10 ⁷	40,1	-	30.10 ⁷	40,5	-
Kk-DR3	18,0.10 ⁷	38,7	-	30.10 ⁷	40,0	-	30.10 ⁷	40,5	-

Dilanjutkan

Lanjutan

Kode	Hari IV			Hari V				Hari VI	Hari VII
	Dosis Trip/ml	Suhu rektal	Ulas darah	Dosis Trip/ml	Suhu rektal	Ulas darah	Dosis Terapi	Ulas darah	Ulas darah
Ka-DR1	20,9.10 ⁷	41,2	-	30.10 ⁷	41,7	+	3,5 mg	+	+
Kb-DR1	20,9.10 ⁷	41,0	-	30.10 ⁷	41,6	+	3,5 mg	+	-
Kc-DR1	20,9.10 ⁷	40,8	-	30.10 ⁷	41,8	+	3,5 mg	-	-
Kf-DR2	30,0.10 ⁷	40,5	-	35.10 ⁷	41,9	+	5,0 mg	-	-
Kg-DR2	30,0.10 ⁷	40,7	-	35.10 ⁷	41,5	+	5,0 mg	-	-
Kh-DR2	30,0.10 ⁷	40,8	-	35.10 ⁷	41,7	+	5,0 mg	-	-
Ki-DR3	20,0.10 ⁷	40,8	-	30.10 ⁷	41,5	+	7,0 mg	-	-
Kj-DR3	20,0.10 ⁷	40,7	-	30.10 ⁷	41,5	+	7,0 mg	-	-
Kk-DR3	20,0.10 ⁷	40,8	-	30.10 ⁷	41,7	+	7,0 mg	-	-

Dilanjutkan

Lanjutan

Kode	Hari VIII		Hari IX		Hari X		Hari XI		Hari XII		Hari XIII		Hari XIV		Hari XV	
	uls	bio	uls	bio	uls	bio	uls	bio	uls	bio	uls	bio	Uls	bio	uls	bio
Ka-DR1	+	2+	++	3+	++	†	++		++		++		++		++	
Kb-DR1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Kc-DR1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Kf-DR2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Kg-DR2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Kh-DR2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ki-DR3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Kj-DR3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Kk-DR3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Dilanjutkan

Lanjutan

Kode	Hari XVI		Hari XVII		Hari XVIII		s/d Hari XXV		s/d Hari XXXV		s/d Hari LII	
	Uls	bio	uls	bio	ul	bio	uls	bio	uls	bio	uls	bio
Ka-DR1	+	2+	++	3+	2+	†	2+/3+		3+		3+	
Kb-DR1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Kc-DR1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Kf-DR2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Kg-DR2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Kh-DR2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ki-DR3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Kj-DR3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Kk-DR3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

uls = ulas darah

bio = pengamatan pada mencit

5.2 Perancangan Regimen Dosis Berulang (Tahap II)**5.2.1 Penentuan dosis terapi**

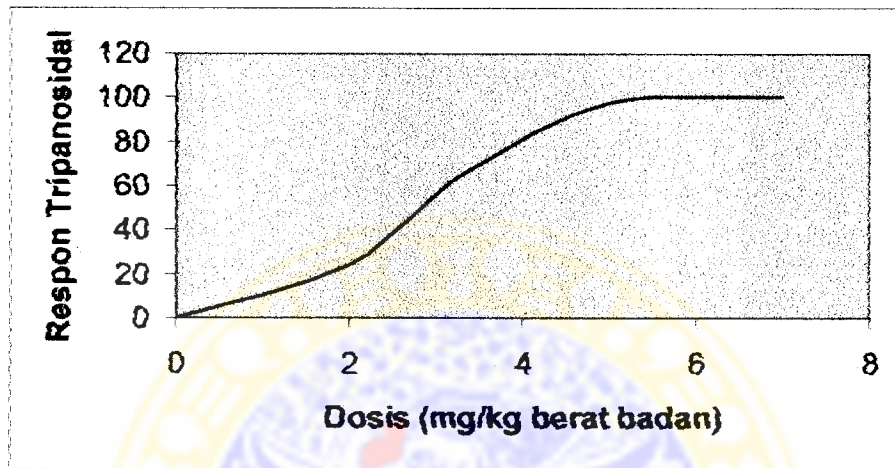
Dalam analisis probit studi hubungan dosis terhadap respon, maka dosis median dalam rentang respon tripanosidal 66 % - 100 % ditemui pada log 0, 638 (Tabel 5.15, Lampiran 23). Dengan demikian antilog 0,638 adalah 4,345, dan harga tersebut mencapai respon tripanosidal 83,3 % ($100\% - 66\% / 2 + 66\%$). Bila dikehendaki efektif respon tripanosidal 100 %, maka dibutuhkan dosis $(100\%/83,3\%) \times 4,345 = 5,22$ mg/kg berat badan.

Perolehan dosis 5,22 mg/kg berat badan sekaligus merupakan dosis lazim untuk pengobatan kasus infeksi *Tripanosoma evansi* isolat salah satu penimbul wabah di Indonesia (isolat Bangkalan).

Gambaran hubungan antara dosis dengan respon tripanosidal pada grafik ukur seperti pada Gambar 5.9., dengan aksis log dosis (sumbu x) dan % respon tripanosidal (sumbu y).

Tabel 5.15. Analisis probit dosis terhadap respon tripanosidal

Kode Kambing	Dosis (mg/kgbb)	Log Dosis	Jumlah kesembuhan kambing dari 3 ekor	Respon (%)	Probit
Ka-c-DR1	3,5	0,544	2	66,66	5,44
Kf-h-DR2	5,0	0,699	3	100,00	8,09
Ki-k-DR3	7,0	0,845	3	100,00	8,09



Gambar 5.9. Hubungan antara dosis diminazene aseturat dengan respon tripanosidal pada kambing PE penderita *T. evansi* isolat Bangkalan

5.2.2 Penentuan batas kadar terapi

Perolehan dosis efektif minimum 5,22 mg/kg berat badan, melalui Persamaan 8 serta besaran parameter kinetik rerata penderita tertular (Tabel 5.10), menghasilkan kadar efektif minimum 13,29 $\mu\text{g/ml}$ (Lampiran 24). Perolehan kadar efektif 13,29 $\mu\text{g/ml}$ merupakan batas kadar terapeutik yang di pilih (*minimum therapeutic concentration* MTC). Landasan pemilihan batas kadar terapeutik berdasarkan pertimbangan pengerjaan studi *in vitro* kadar tripanosidal (Tabel 5.3) yaitu masih di atas kadar tripanosidal secara *in vitro* ($> 9,54 \mu\text{g/ml}$).

5.2.3 Penentuan dosis muatan

Hasil perolehan dosis efektif minimum bila dijadikan dosis muatan maka akan menghasilkan harga 10,44 mg/kg berat badan (dua kali 5,22 mg/kg berat badan).

5.2.4 Penentuan dosis penjagaan

Perolehan harga batas kadar terapeutik (13,29 $\mu\text{g/ml}$) ternyata tak terpaut jauh bila dibandingkan rerata kadar maksimum pemberian 7 mg/kg berat badan penderita tertular (13,40 \pm 8,13 $\mu\text{g/ml}$). Dengan demikian dosis penjagaan ditetapkan 7 mg/kg berat badan, dengan pertimbangan mampu menghasilkan kadar sedikit di atas kadar batas terapeutik.

5.2.5 Penentuan interval waktu pemberian

Dosis muatan dan MTC bila bersama besaran kinetika rerata berat badan, V_d , β penderita tertular (Tabel 5.10) dihitung melalui Persamaan 18, akan menghasilkan harga interval pemberian berulang (τ) \pm 30,37 menit (dinaikkan 31 menit). Dengan demikian interval waktu pemberian diminazen aseturat secara berulang di rancang tiap 31 menit (Lampiran 24).

5.2.6 Penentuan jumlah pemberian ulangan

Perancangan jumlah ulangan (n) dilakukan dengan memperkirakan kadar obat yang terdapat dalam tubuh bila

diberikan dosis tunggal 10,44 mg/kg berat badan. Perkiraan kadar obat yang diperoleh dilakukan penumpukan dengan kadar obat pemberian tunggal 7 mg/kg berat badan dan dimulai setiap interval waktu 31 menit (superposisi). Hasil jumlah penumpukan kadar menunjukkan pemberian ulangan sebanyak empat kali mampu mempertahankan kadar minimum batas terapi selama ≥ 24 jam (Lampiran 25, Lampiran 26). Hasil perancangan regimen dosis pemberian berulang diminazen aseturat tampak pada Tabel 5.16.

Tabel 5.16. Regimen dosis pemberian berulang

Dosis muatan	10,44 mg/kg berat badan
Dosis penjagaan	7 mg/kg berat badan
Interval pemberian	31 menit
Jumlah pemberian dosis penjagaan	4 kali

5.3 Uji Klinik

5.3.1 Uji tripanosidal

Hasil pengerjaan uji tripanosidal antara dua kelompok secara rinci tampak pada Tabel 5.17 dan Tabel 5.18. Pencapaian dosis kumulatif penularan *Tripanosoma/ml* (Trip/ml) agar menimbulkan parasitemia rerata diperoleh pada 287.10^7 Trip/ml. Kemunculan parasitemia terjadi hari ke enam, dan menjelang hari ke tujuh kondisi parasitemia makin meningkat seiring dengan makin bertambahnya dosis penularan. Pada hari ke tujuh dalam masa penularan, ditemui kondisi parasitemia positif dua. Jumlah akumulasi dosis penularan hingga hari ke tujuh baik kelompok

tertular maupun kelompok kontrol pada kondisi parasitemia ++ 334, 14.10^7 Trip/ml.

Pada hari ke delapan kelompok perlakuan diberikan pengobatan dan hasil pemeriksaan lima jam pasca pengobatan menunjukkan bahwa terjadi penurunan kondisi parasitemia dari positif dua ke positif satu (Gambar 5.10). Hal tersebut tak ditemui pada kelompok kontrol dengan kondisi makin terjadi perkembangan parasitemia. Puncak parasitemia kelompok kontrol mulai dirasakan hari ke 32 sejak pertama kali penularan dilakukan dengan ditemuinya kasus kematian.

Hasil studi tripanosidal antar kelompok hari ke 25 pasca pengobatan, menunjukkan pengobatan dengan rancangan regimen dosis berulang mampu bersifat tripanosidal ($p < 0,05$, Tabel 5.19, Lampiran 27).

Tinjauan pengamatan nilai Hb menunjukkan secara umum terjadi penurunan seiring dengan perkembangan parasitemia. Pengamatan Hb khusus kelompok perlakuan menunjukkan, 30 hari pasca pengobatan secara perlahan meningkat seiring dengan terjadinya eliminasi parasit. Kenaikan nilai Hb pada kelompok perlakuan (cyde-1 s/d cyde-7) secara perlahan mendekati nilai rentang normal Hb kambing pada umumnya (8-15 g %). Pengamatan nilai Hb pada kelompok kontrol menunjukkan adanya penurunan cukup mencolok dan mendekati 2-3 minggu masa infeksi, nilai Hb umumnya di bawah harga normal kambing.

Tabel 5.17. Hasil pengerjaan tripanosidal kelompok perlakuan

Kode	Hb (g%)	Hari ke 1		Hari ke 2		Hari ke 3		Hari ke 4		Hari ke 5		Hari ke 6		Hari ke 7, Hb			Hari ke 8	
		Trip/ml	Uls	Trip/ml	Uls	Trip/ml	Uls	Trip/ml	Uls	Trip/ml	Uls	Trip/ml	Uls	Trip/ml	Uls	(g%)	Terapi	5 jam
Cyde-1	11,40	68.10 ⁷	-	10.10 ⁷	-	81.10 ⁷	-	97.10 ⁷	-	23.10 ⁷	-	30.10 ⁷	+	60.10 ⁷	++	10,20	10,44 7 (1x) 7 (2x) 7 (3x) 7 (4x)	+
Cyde-2	11,20	68.10 ⁷	-	11.10 ⁷	-	9.10 ⁷	-	22.10 ⁷	-	40.10 ⁷	-	40.10 ⁷	+	40.10 ⁷	++	10,40		-
Cyde-3	11,50	30.10 ⁷	-	55.10 ⁷	-	60.10 ⁷	-	60.10 ⁷	-	40.10 ⁷	-	40.10 ⁷	+	30.10 ⁷	++	10,60		-
Cyde-4	12,80	30.10 ⁷	-	10.10 ⁸	-	45.10 ⁷	-	40.10 ⁷	-	30.10 ⁷	-	55.10 ⁷	+	50.10 ⁷	++	9,80		-
Cyde-5	12,00	40.10 ⁷	-	30.10 ⁷	-	50.10 ⁷	-	60.10 ⁷	-	50.10 ⁷	+	45.10 ⁷	++	50.10 ⁷	++	9,90		+
Cyde-6	13,10	40.10 ⁷	-	60.10 ⁷	-	60.10 ⁷	-	60.10 ⁷	-	50.10 ⁷	+	50.10 ⁷	+	50.10 ⁷	++	10,10		+
Cyde-7	12,50	50.10 ⁷	-	60.10 ⁷	-	60.10 ⁷	-	60.10 ⁷	-	50.10 ⁷	-	50.10 ⁷	+	50.10 ⁷	++	10,50		+
Rerata	12,07	46,57.10 ⁷		46,57.10 ⁷		52,14.10 ⁷		57.10 ⁷		40,43.10 ⁷		44,29.10 ⁷		47,14.10 ⁷			= Σ 33,41.10 ⁸	

Dilanjutkan

Lanjutan

Kode	10 Jam	1 Hari	2 Hari	3 Hari	4 Hari	5 Hari	6 Hari	7 hari	8 Hari	9 Hari	10 Hari	11 Hari
Cyde-1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cyde-2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cyde-3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cyde-4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cyde-5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cyde-6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cyde-7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Dilanjutkan

Lanjutan

Kode	12 hari	13 Hari	14 Hari	15 Hari	16 Hari	17 Hari	18 Hari	19 hari	20 Hari	25 Hari	30 hari, Hb (g%)	s/d 45 Hari
Cyde-1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	11,00	-
Cyde-2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10,50	-
Cyde-3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	12,00	-
Cyde-4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	12,50	-
Cyde-5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	12,30	-
Cyde-6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	13,10	-
Cyde-7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	12,20	-

Tabel 5.18. Hasil pengerjaan tripanosidal kelompok kontrol

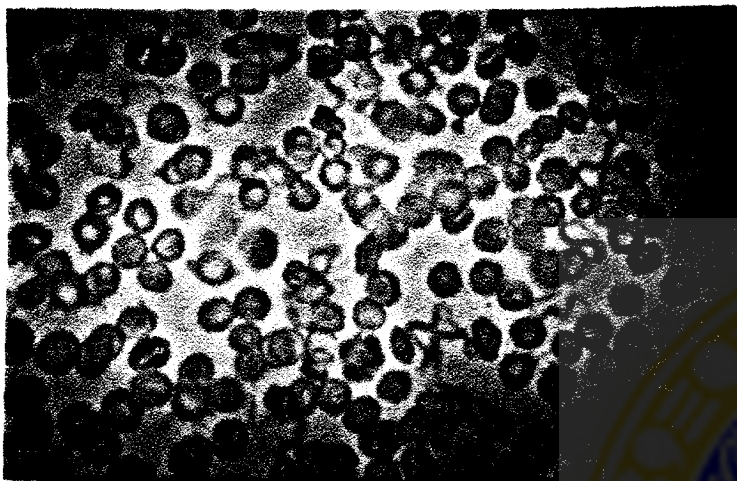
Kode	Hb (g%)	1 hari		2 hari		3 hari		4 hari		5 hari		6 hari		7 hari, Hb			8 hari
		Trip/ml	Uls	Trip/ml	Uls	Trip/ml	Uls	Trip/ml	Uls	Trip/ml	Uls	Trip/ml	Uls	Trip/ml	Uls	(g%)	
K-1	12,00	68.10 ⁷	-	10.10 ⁷	-	81.10 ⁷	-	97.10 ⁷	-	23.10 ⁷	-	30.10 ⁷	+	60.10 ⁷	++	11,20	++
K-2	11,30	68.10 ⁷	-	11.10 ⁷	-	9.10 ⁷	-	22.10 ⁷	-	40.10 ⁷	-	40.10 ⁷	+	40.10 ⁷	++	11,10	++
K-3	12,10	30.10 ⁷	-	55.10 ⁷	-	60.10 ⁷	-	60.10 ⁷	-	40.10 ⁷	-	40.10 ⁷	+	30.10 ⁷	++	11,80	++
K-4	12,50	30.10 ⁷	-	10.10 ⁸	-	45.10 ⁷	-	40.10 ⁷	-	30.10 ⁷	-	55.10 ⁷	+	50.10 ⁷	++	10,90	++
K-5	11,50	40.10 ⁷	-	30.10 ⁷	-	50.10 ⁷	-	60.10 ⁷	-	50.10 ⁷	-	45.10 ⁷	+	50.10 ⁷	++	10,80	++
K-6	11,20	40.10 ⁷	-	60.10 ⁷	-	60.10 ⁷	-	60.10 ⁷	-	50.10 ⁷	-	50.10 ⁷	+	50.10 ⁷	++	10,20	++
K-7	10,40	50.10 ⁷	-	60.10 ⁷	-	60.10 ⁷	-	60.10 ⁷	-	50.10 ⁷	-	50.10 ⁷	+	50.10 ⁷	++	10,20	++
Rerata	11,57	46,57.10⁷		46,57.10⁷		52,14.10⁷		57.10⁷		40,43.10⁷		44,29.10⁷		47,14.10⁷		= Σ 33,41.10⁸	
Kode	9 hari	10 Hari	11 Hari	12 Hari	13 Hari	14 Hari	15 Hari	16 hari	17 Hari	18 Hari	19 Hari	20 Hari					
K-1	++	++	++	++	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++					
K-2	++	++	++	++	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++					
K-3	++	++	++	++	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++					
K-4	++	++	++	++	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++					
K-5	++	++	++	++	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++					
K-6	++	++	++	++	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++					
K-7	++	++	++	++	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++					
Kode	21 hari	22 Hari	23 Hari	24 Hari	24 Hari	26 Hari	27 Hari	s/d 30 hari, Hb (g%)	31 hari	32 hari	33 hari	34 hari	35 hari				
K-1	+++	+++	++++	++++	++++	++++	++++	6,70	+++	Mati							
K-2	+++	+++	+++	++++	++++	++++	++++	7,20	++++	++++	Mati						
K-3	+++	+++	+++	+++	++++	++++	++++	7,60	++++	++++	++++	Mati					
K-4	+++	+++	++++	++++	++++	++++	++++	7,80	++++	++++	++++	++++	Mati				
K-5	+++	+++	++++	++++	++++	++++	++++	7,60	++++	++++	++++	++++	++++				
K-6	+++	+++	++++	++++	++++	++++	++++	8,20	++++	++++	++++	++++	++++				
K-7	+++	+++	++++	++++	++++	++++	++++	7,70	++++	++++	++++	Mati					
Kode	36 hari	37 Hari	38 Hari	s/d 41 Hari													
K-5	++++	Mati															
K-6	++++	++++	++++	Mati													

Perkembangan parasitemia makin meningkat seiring dengan berjalannya waktu dan nampak pada hari ke 27 (parasitemia +++) selama masa uji tripanosidal (Gambar 5.11.e).

Seri ulas darah hasil uji tripanosidal dapat diikuti pula pada Gambar 5.12 dengan pewarnaan *Acridine orange*. Penggunaan cat *Acridine orange* menghasilkan ketajaman nyata terutama bentukan morfologi kinetoplas di daerah bulu cambuk. Keadaan tersebut akan sulit ditemukan bila preparat ulas dilakukan menggunakan pengecatan Giemsa.

Gambar 5.12 (a) tampak nyata parasit *T. evansi* pada salah satu subyek perlakuan hari ke tujuh masa penularan. Gambar 5.12 (b) adalah hasil ulas darah subyek perlakuan 5 jam pasca pengobatan. Dalam Gambar 5.12 (b) terlihat jelas sangat sedikit jumlah tripanosoma yang ditemukan. Gambar 5.12 (c) dan Gambar 5.12 (d) menunjukkan peningkatan perkembangan parasitemia subyek kontrol. Peningkatan tersebut dari waktu ke waktu makin berkembang yang ditandai dengan peningkatan suhu badan.

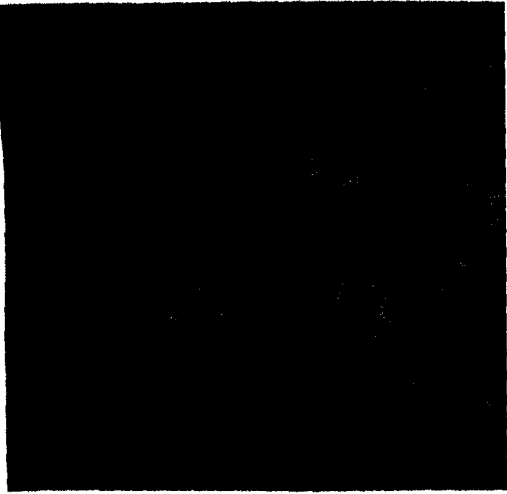
Pada Gambar 5.12(c) dan Gambar 5.12 (d) sangat nyata sekali bentuk tripomastigot parasit dewasa dengan kinetoplastid di bagian bulu cambuk. Bentuk tripomastigot menunjukkan bahwa parasit tumbuh dan berkembang dalam tubuh kambing dan pada tingkat parasitemia positif empat akan mudah ditemukan dalam percabangan buluh darah sentral (V. Jugularis).



Gambar 5.11a. 7 hari masa penularan subyek perlakuan (pewarnaan Giemsa, 400x)



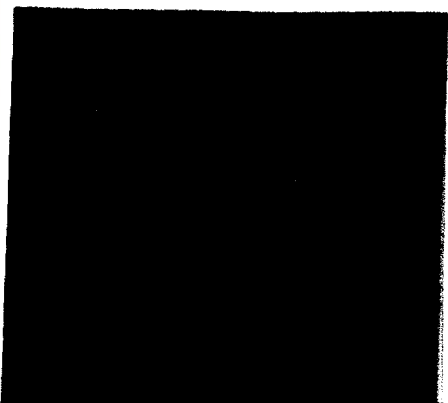
Gambar 5.11.b. 5 jam pasca pengobatan subyek perlakuan (pewarnaan Giemsa, 400x)



Gambar 5.11.c. 24 jam pasca pengobatan subyek perlakuan (pewarnaan Giemsa, 400x)

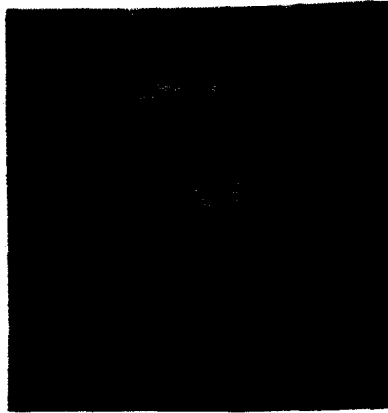


Gambar 5.11.d. 7 hari masa penularan subyek kontrol (pewarnaan Giemsa, 400x)

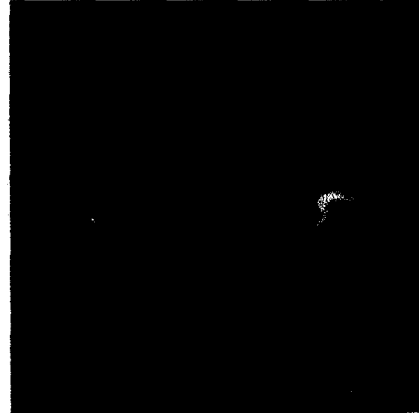


Gambar 25.11.e. 27 hari masa uji tripanosidal subyek kontrol (pewarnaan Giemsa, 400x)

Gambar 5.11. Hasil ulas darah uji tripanosidal subyek perlakuan dan kontrol pewarnaan Giemsa



Gambar 5.12.a 7 hari masa penularan subyek perlakuan (pewarnaan *Acridine Orange*, 400x)



Gambar 5.12.b 5 jam pasca pengobatan subyek perlakuan (pewarnaan *Acridine Orange*, 400x)



Gambar 5.12.c 7 hari masa penularan subyek kontrol (pewarnaan *Acridine Orange*, 400x)



Gambar 5.12.d 27 hari masa uji tripanosidal subyek kontrol (pewarnaan *Acridine Orange*, 400x)

Gambar 5.12. Hasil ulas darah uji tripanosidal subyek perlakuan dan kontrol (pewarnaan *Acridine Orange*)

5.3.2 Uji biologis

Hasil uji biologis pada mencit menunjukkan hingga 45 hari masa pengamatan, tak ditemui adanya pertumbuhan parasit dalam tubuh mencit. Ketiadaan parasit dalam darah kambing tertular pasca pengobatan menunjukkan keberhasilan regimen dosis diminazen aseturat hasil rancangan pemberian berulang. Pada analisis kelompok mencit terinokulasi darah kambing tertular pasca pengobatan dengan kelompok mencit terinokulasi agen plasebo, menunjukkan hasil pengobatan mampu mengeliminasi parasit ($p < 0,05$ Lampiran 28). Hasil lebih rinci mengenai uji biologis baik pada kelompok mencit perlakuan maupun kelompok kontrol dapat diikuti pada Tabel 5.20.

Tabel 5.20. Uji biologis darah kambing tertular

Hari	Darah kambing tertular pasca Tx.							Kontrol (darah positif +stabilat)						
	1	2	3	4	5	6	7	1	2	3	4	5	6	7
1 – 3	3/0 ^a	3/0 ^a	3/0 ^a	3/0 ^a	3/0 ^a	3/0 ^a	3/0 ^a	3/3 ^b	3/3 ^b	3/3 ^b	3/3 ^b	3/3 ^b	3/3 ^b	3/3 ^b
4 – 6	3/0 ^a	3/0 ^a	3/0 ^a	3/0 ^a	3/0 ^a	3/0 ^a	3/0 ^a	3/3 ^b	3/3 ^b	3/3 ^b	3/3 ^b	3/3 ^b	3/3 ^b	3/3 ^b
7 – 9	3/0 ^a	3/0 ^a	3/0 ^a	3/0 ^a	3/0 ^a	3/0 ^a	3/0 ^a	3/3 ^b	3/3 ^b	3/3 ^b	3/3 ^b	3/3 ^b	3/3 ^b	3/3 ^b
10 – 12	3/0 ^a	3/0 ^a	3/0 ^a	3/0 ^a	3/0 ^a	3/0 ^a	3/0 ^a	3/3 ^b	3/3 ^b	3/3 ^b	3/3 ^b	3/3 ^b	3/3 ^b	3/3 ^b
13 – 15	3/0 ^a	3/0 ^a	3/0 ^a	3/0 ^a	3/0 ^a	3/0 ^a	3/0 ^a	3/3 ^b	3/3 ^b	3/3 ^b	3/3 ^b	3/3 ^b	3/3 ^b	3/3 ^b
16 – 18	3/0 ^a	3/0 ^a	3/0 ^a	3/0 ^a	3/0 ^a	3/0 ^a	3/0 ^a	3/3 ^b	3/3 ^b	3/3 ^b	3/3 ^b	3/3 ^b	3/3 ^b	3/3 ^b
19 – 21	3/0 ^a	3/0 ^a	3/0 ^a	3/0 ^a	3/0 ^a	3/0 ^a	3/0 ^a	3/3 ^b	3/3 ^b	3/3 ^b	3/3 ^b	3/3 ^b	3/3 ^b	3/3 ^b
22 – 24	3/0 ^a	3/0 ^a	3/0 ^a	3/0 ^a	3/0 ^a	3/0 ^a	3/0 ^a	3/3 ^b	3/3 ^b	3/3 ^b	3/3 ^b	3/3 ^b	3/3 ^b	3/3 ^b
25 – 27	3/0 ^a	3/0 ^a	3/0 ^a	3/0 ^a	3/0 ^a	3/0 ^a	3/0 ^a	3/3 ^b	3/3 ^b	3/3 ^b	3/3 ^b	3/3 ^b	3/3 ^b	3/3 ^b
28 – 30	3/0 ^a	3/0 ^a	3/0 ^a	3/0 ^a	3/0 ^a	3/0 ^a	3/0 ^a	3/3 ^b	3/3 ^b	3/3 ^b	3/3 ^b	3/3 ^b	3/3 ^b	3/3 ^b
31 – 33	3/0 ^a	3/0 ^a	3/0 ^a	3/0 ^a	3/0 ^a	3/0 ^a	3/0 ^a	3/3 ^b	3/3 ^b	3/3 ^b	3/3 ^b	3/3 ^b	3/3 ^b	3/3 ^b
34 – 36	3/0 ^a	3/0 ^a	3/0 ^a	3/0 ^a	3/0 ^a	3/0 ^a	3/0 ^a	3/3 ^b	3/3 ^b	3/3 ^b	3/3 ^b	3/3 ^b	3/3 ^b	3/3 ^b
37 – 39	3/0 ^a	3/0 ^a	3/0 ^a	3/0 ^a	3/0 ^a	3/0 ^a	3/0 ^a	3/3 ^b	3/3 ^b	3/3 ^b	3/3 ^b	3/3 ^b	3/3 ^b	3/3 ^b
40 – 42	3/0 ^a	3/0 ^a	3/0 ^a	3/0 ^a	3/0 ^a	3/0 ^a	3/0 ^a	3/3 ^b	3/3 ^b	3/3 ^b	3/3 ^b	3/3 ^b	3/3 ^b	3/3 ^b
43 – 45	3/0 ^a	3/0 ^a	3/0 ^a	3/0 ^a	3/0 ^a	3/0 ^a	3/0 ^a	3/3 ^b	3/3 ^b	3/3 ^b	3/3 ^b	3/3 ^b	3/3 ^b	3/3 ^b

3/0 : Tiga ekor mencit yang digunakan, tak ada menderita parasitemia

3/3 : Tiga ekor mencit yang digunakan, tiga ekor menderita parasitemia

Superskrip sama pada kolom berbeda, berbeda nyata ($p < 0,05$, Lampiran 28)

5.3.3 Uji toksisitas

Pengamatan gejala klinik

Hasil pengamatan menunjukkan ekspresi kriteria gejala klinik tingkat subakut adalah, tremor. Jumlah subyek dengan gejala tremor satu ekor (kelompok perlakuan P1). Gejala tersebut timbul 24 jam pasca pengobatan, dan semakin berkurang 48 jam kemudian. Tepat 72 jam pasca pengobatan gejala tersebut tak ditemukan.

Hasil pengamatan gejala toksisitas akut adalah gejala *anorexia nervosa* ditemukan pada tiga ekor kambing dari kelompok perlakuan (P1, P4, P5). Timbulnya gejala mulai terlihat 24 jam pasca pengobatan, menjelang 48 jam pasca pengobatan secara perlahan terjadi peningkatan nafsu makan. Tepat 72 jam pasca pengobatan nafsu makan ke tiga ekor subyek mendekati sediakala. Respon klinik toksisitas tambahan adalah ditemukannya ekspresi gejala pengeluaran *gland penis* (satu ekor subyek P4) 24 jam pasca pengobatan. Gejala klinik tersebut berangsur-angsur hilang 48 jam pasca pengobatan dan makin tak tampak tepat 72 jam pasca pengobatan. Respon klinik lain adalah djumpainya ekspresi rasa kesakitan di daerah penyuntikan dengan manifestasi kepincangan disertai memperlambat langkah jalan.

Rasa sakit di daerah penyuntikan dimanifestasikan timbul naluri menghindar saat dilakukan palpasi di bagian penyuntikan. Jumlah subyek dengan ekspresi kebengkakan di daerah penyuntikan lima

ekor (P1 hingga P5). Ekspresi kemunculan kebengkakan di daerah penyuntikan dimulai 24 jam pasca pengobatan dan tetap membengkak hingga 72 jam pasca pengobatan. Tepat 96 jam pasca pengobatan ekspresi kebengkakan di daerah penyuntikan mengalami kepulihan.

Hasil uji hipotesis menunjukkan kelompok perlakuan pada dasarnya sama dengan kelompok kontrol dalam memanifestasikan gejala klinik ($p > 0,05$, Tabel 5.21, Lampiran 29).

Tabel 5.21. Gejala klinik toksik pemberian diminazen aseturat

Tingkat	Pengamatan fisiologi		Jumlah subyek dari 5 ekor			
	Subakut	Gejala klinik toksikitas obat	Perlakuan (P1-P5)		Kontrol (K1-K5)	
Muncul			Tak muncul	Muncul	Tak muncul	
	1	<i>Defecation</i>	0 ekor	5 ekor ^a	0 ekor	5 ekor ^b
	2	<i>Hyperaesthetic</i>	0 ekor	5 ekor ^a	0 ekor	5 ekor ^b
	3	<i>Tremor</i>	1 ekor	4 ekor ^a	0 ekor	5 ekor ^b
	4	<i>Itching</i>	0 ekor	5 ekor ^a	0 ekor	5 ekor ^b
	5	<i>Urination frequent</i>	0 ekor	5 ekor ^a	0 ekor	5 ekor ^b
	6	Geraham bergetar	0 ekor	5 ekor ^a	0 ekor	5 ekor ^b
	7	Penurut	0 ekor	5 ekor ^a	0 ekor	5 ekor ^b
Tambahan	9	<i>Tachicardia</i>	0 ekor	5 ekor ^a	0 ekor	5 ekor ^b
	10	<i>Hipersalivation</i>	0 ekor	5 ekor ^a	0 ekor	5 ekor ^b
	11	<i>Oedematus alergica</i>	0 ekor	5 ekor ^a	0 ekor	5 ekor ^b
	12	<i>Midriatik</i>	0 ekor	5 ekor ^a	0 ekor	5 ekor ^b
		<i>Anaphylactic syok</i>	0 ekor	5 ekor ^a	0 ekor	5 ekor ^b
Akut	1	<i>Anoreksia nervosa</i>	3 ekor	2 ekor ^a	0 ekor	5 ekor ^b
	2	<i>Clonis convultion</i>	0 ekor	5 ekor ^a	0 ekor	5 ekor ^b
	3	<i>Dispnoe</i>	0 ekor	5 ekor ^a	0 ekor	5 ekor ^b
	4	<i>Regurgitasi</i>	5 ekor	0 ekor ^a	5 ekor	0 ekor ^b
	5	<i>Recumbency</i>	0 ekor	5 ekor ^a	0 ekor	5 ekor ^b
Catatan	1.	Sakit di daerah penyuntikan	5 ekor	0 ekor ^a	0 ekor	5 ekor ^b
	2.	<i>Gland penis</i> keluar	1 ekor	4 ekor ^a	0 ekor	5 ekor ^b

Superskrip sama pada kolom berbeda, tak berbeda nyata $p > 0,05$ (Lampiran 29)

Pemeriksaan makroskopis organ hati ginjal

Hasil pemeriksaan makroskopis organ hati dan ginjal menunjukkan subyek perlakuan pemberian berulang diminazen aseturat tak ditemui pembengkakan ($p > 0,05$, Lampiran 30.1 – Lampiran 30.5). Hasil pemeriksaan makroskopis hati lebih lanjut tampak pada Tabel 5.22.

Tabel 5.22. Pemeriksaan makroskopis hati dan ginjal

Garis (cm)	Hati Perlakuan (P1) Berat tubuh hidup 26,0 Kg Berat tubuh mati 24,0 Kg				Hati Kontrol Sakit (K1) Berat tubuh hidup 26,0 Kg Berat tubuh mati 18,0 Kg			
	Ukuran (cm)		Berat (g)		Ukuran (cm)		Berat (g)	
A	12,0 ^a		400		12,5 ^b		389	
B	10,5 ^a				11,0 ^b			
C	20,5 ^a				21,0 ^b			
Warna	Tak terdapat perubahan				Terdapat perubahan			
Limbus	Tak terdapat kebengkakan/nodul				Terdapat kebengkakan /nodul			
	Ginjal Perlakuan				Ginjal Kontrol Sakit			
	Ukuran (cm)		Berat (g)		Ukuran (cm)		Berat (g)	
	Kanan	Kiri	Kanan	Kiri	Kanan	Kiri	Kanan	Kiri
A	3,5 ^a	3,5 ^a	45	45	4,0 ^b	4,0 ^b	47	43
B	6,5 ^a	6,5 ^a			6,4 ^b	4,2 ^b		
Warna	Baik	Baik			Pucat	Baik		

Garis (cm)	Hati Perlakuan (P2) Berat tubuh hidup 26,0 Kg Berat tubuh mati 24,0 Kg				Hati Kontrol Sakit (K2) Berat tubuh hidup 28,0 Kg Berat tubuh mati 26,0 Kg			
	Ukuran (cm)		Berat (g)		Ukuran (cm)		Berat (g)	
A	13,5 ^a		450		15,5 ^b		475	
B	13,0 ^a				15,0 ^b			
C	17,5 ^a				18,0 ^b			
Warna	Tak terdapat perubahan				Perubahan (merah-pucat)			
Limbus	Tak terdapat kebengkakan/nodul				Terdapat kebengkakan, nodul nihil			
	Ginjal Perlakuan				Ginjal Kontrol			
	Ukuran (cm)		Berat (g)		Ukuran (cm)		Berat (g)	
	Kanan	Kiri	Kanan	Kiri	Kanan	Kiri	Kanan	Kiri
A	6,0 ^a	6,0 ^a	49	49	5,0 ^b	6,0 ^b	45	50
B	3,5 ^a	3,5 ^a			2,8 ^b	3,8 ^b		
Warna	Baik ^a	Baik ^a			Pucat	Baik		

Dilanjutkan

Lanjutan

Garis (cm)	Hati Perlakuan (P3) Berat tubuh hidup 26,0 kg Berat tubuh mati 25,0 kg				Hati Kontrol Sakit (K3) Berat tubuh hidup 26,0 kg Berat tubuh mati 24,5 kg			
	Ukuran (cm)		Berat (g)		Ukuran (cm)		Berat (g)	
A	13,0 ^a		550		14,0 ^b		480	
B	11,5 ^a				12,5 ^b			
C	21,0 ^a				22,0 ^b			
Warna	Tak terdapat perubahan				Terdapat perubahan (kehitaman)			
Limbus	Tak terdapat kebengkakan/nodul				Tak terdapat kebengkakan/nodul			
	Ginjal Perlakuan				Ginjal Kontrol Sakit			
	Ukuran (cm)		Berat (g)		Ukuran (cm)		Berat (g)	
	Kanan	Kiri	Kanan	Kiri	Kanan	Kiri	Kanan	Kiri
A	5,6 ^a	5,6 ^a	40	40	5,7 ^b	5,0 ^b	41	38
B	3,0 ^a	3,0 ^a			3,2 ^b	3,0 ^b		
Warna	Baik	Baik			Baik	Pucat		

Garis (cm)	Hati Perlakuan (P4) Berat tubuh hidup 25,0 Kg Berat tubuh mati 22,0 Kg				Hati Kontrol Sakit (K4) Berat tubuh hidup 25,0 Kg Berat tubuh mati 23,0 Kg			
	Ukuran (cm)		Berat (g)		Ukuran (cm)		Berat (g)	
A	13,5 ^a		501		11,5 ^b		495	
B	12,0 ^a				11,0 ^b			
C	18,2 ^a				16,0 ^b			
Warna	Tak terdapat perubahan				Terdapat perubahan (kepuatan)			
Limbus	Tak terdapat kebengkakan/nodul				Terdapat kebengkakan/nodul			
	Ginjal Perlakuan				Ginjal Kontrol Sakit			
	Ukuran (cm)		Berat (g)		Ukuran (cm)		Berat (g)	
	Kanan	Kiri	Kanan	Kiri	Kanan	Kiri	Kanan	Kiri
A	6,0 ^a	6,0 ^a	45	45	6,0 ^b	5,0 ^b	45	40
B	3,2 ^a	3,2 ^a			3,3 ^b	3,0 ^b		
Warna	Baik	Baik			Baik	Pucat		

Garis (cm)	Hati Perlakuan (P5) Berat tubuh hidup 26,0 kg Berat tubuh mati 22,0 kg				Hati Kontrol Sakit (K5) Berat tubuh hidup 27,0 Kg Berat tubuh mati 25,0 Kg			
	Ukuran (cm)		Berat (g)		Ukuran (cm)		Berat (g)	
A	12,5 ^a		650		11,0 ^b		600	
B	10,5 ^a				10,5 ^b			
C	21,5 ^a				20,4 ^b			
Warna	Tak terdapat perubahan				Terdapat perubahan			
Limbus	Tak terdapat kebengkakan/nodul				Terdapat kebengkakan/nodul			
	Ginjal Perlakuan				Ginjal Kontrol Sakit			
	Ukuran (cm)		Berat (g)		Ukuran (cm)		Berat (g)	
	Kanan	Kiri	Kanan	Kiri	Kanan	Kiri	Kanan	Kiri
A	6,0 ^a	6,0 ^a	41	41	6,0 ^b	7,0 ^b	35	38
B	4,0 ^a	4,0 ^a			3,0 ^b	4,0 ^b		
Warna	Baik	Baik			Pucat	Baik		

Superskrip berbeda pada lajur sama, tidak berbeda nyata $p > 0,05$
(Lampiran 30.1-30.5)

Pemeriksaan histopatologi organ hati dan ginjal

Hasil pemeriksaan histopatologi organ hati pada subyek perlakuan menunjukkan susunan sel hati umumnya masih teratur (susunan radier) demikian pula halnya pada kelompok kontrol. Pada bagian sentrolobuler yaitu wilayah segitiga Kieman tak nampak nekrosis sel hati, Pada bagian perilobuler secara umum tak ditemukan sel nekrosis (lisis, piknosis atau karyoreksis). Pada daerah sinusoid tak ditemui adanya pelebaran serta tak mengandung bentukan *vacoula*. Sel hati tak nampak bentukan degenerasi sel (termasuk degenerasi melemak) dengan tanda awal pembesaran sitoplasma sel. Penampakan pembesaran sitoplasma sel pada organ kontrol juga tak ditemui. Bagian vena sentralis seperti umumnya kasus *post mortem* yaitu tampak dipenuhi sel eritrosit. Pada bagian tersebut tak nampak kemunculan adanya *Polymorphonuclear cell* (PMN) ataupun eksudasi.

Hasil pemeriksaan histopatologi organ ginjal pada subyek perlakuan menunjukkan bagian kortek tak ditemui keadaan vaskularisasi berlebihan (*haemostaknant*), eksudasi ataupun kemunculan sel PMN. Sel parenchym serta endotel buluh darah tak nampak adanya karyolisis, dan di daerah antara kapsula Bowman dengan bagian kortikomedula ginjal terdapat ruang dengan rongga tak berlebihan. Bagian Glomerulus tak ditemui adanya bentukan pengkerutan atau pembengkakan. Bagian lumen duktus kontortus proksimalis dan distalis tak nampak adanya

penyempitan lumen. Sel dinding lumen duktus kontortus tak terlihat adanya kebengkakan (ditandai dengan pembesaran sel atau sitoplasma membesar dan inti piknosis).

Secara ringkas hasil pengamatan pemeriksaan histopatologi organ hati dan ginjal, tampak pada Tabel 5.23 dengan uji hipotesis pada Tabel 5.24.

Tabel 5.23. Pengamatan histopatologi organ hati dan ginjal

Pengamatan histopatologi hati	Perlakuan	Kontrol Sakit
	nihil	Ada
Sel nekrosis pada sentrolobuler	√	√
Sel nekrosis pada segi tiga Kieman	√	√
Degenerasi sel melemak sentro - perilobuler	√	√
Sinusoid ditemukan pelebaran	√	√
Vena sentralis terdapat sel PMN	√	√
Pengamatan histopatologi ginjal	Perlakuan	Kontrol Sakit
	nihil	Ada
Haemostaknant, kemunculan PMN sel	√	√
Sel parenchym, dan sel endotel karyolysis	√	√
Penyempitan K. Bowman –medula	√	√
Pengerutan /pembengkakan Glomerulus	√	√
Penyempitan pada lumen duktus kontortus	√	√

√ = terjadi pada ke lima individu setiap kelompok

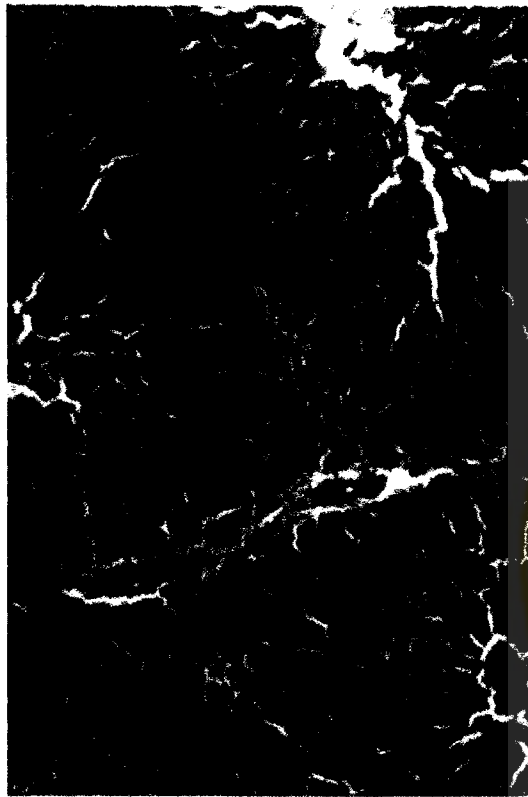
Pada Tabel 5.24., hasil uji hipotesis pengamatan histopatologi organ hati dan ginjal antara kelompok perlakuan dan kontrol, menunjukkan ada perbedaan nyata pada $p < 0,05$ (Lampiran 31). Makna uji hipotesis mengandung arti struktur mikroskopis hati dan ginjal pasca pengobatan, tidak ditemui kerusakan dan tampak seperti pada kontrol. Dengan demikian penggunaan regimen dosis diminazen aseturat hasil perancangan Tahap II tergolong aman.

Tabel 5.24. Uji hipotesis keamanan penggunaan diminazen aseturat melalui pemeriksaan histopatologi organ hati, ginjal

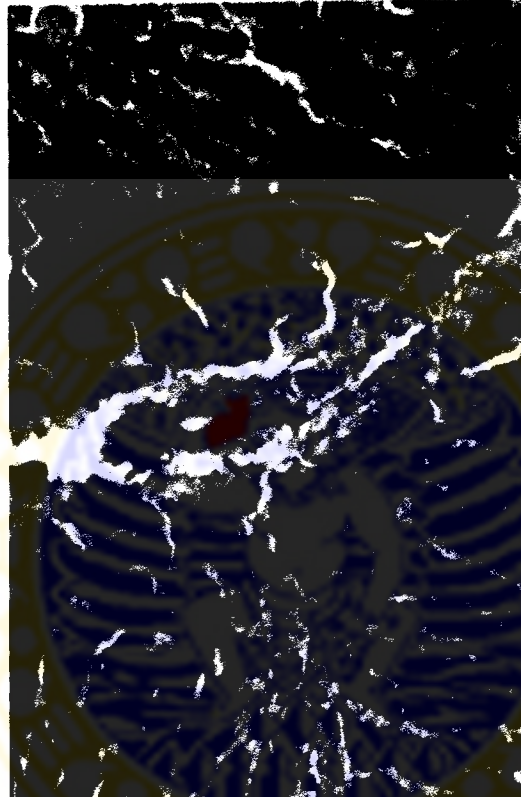
Histopatologi	Perlakuan (ekor)	Kontrol Sakit (ekor)
Kelainan	0 ^c	5 ^b
Tak ada kelainan	5 ^a	0 ^b

Superskrip sama pada kolom berbeda berbeda nyata $p < 0,05$
(Lampiran 31)

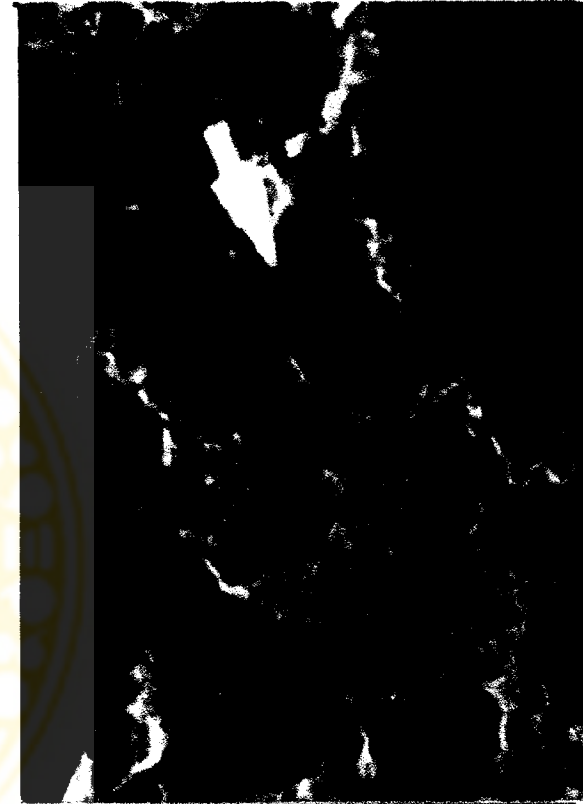
Gambaran umum pengamatan histopatologi organ hati dapat ditemui pada salahsatu subyek perlakuan seperti tampak dalam seri Gambar 5.13 (Gambar 5.13.a, Gambar 5.13.b, Gambar 5.13.c). Gambar 5.13.a tampak daerah segi tiga Kiernan masih teratur dengan vena sentralis tak terjadi *staknant*. Gambar 5.13.b tampak bagian vena sentralis tak mengalami *staknant* sel darah merah. Gambar 5.13.c memperlihatkan kondisi sel hati dengan sitoplasma masih tampak tak membengkak dan inti tak eksentrik dan organel sitoplasma tak ditemui keadaan degenerasi melemak. Seri Gambar 5.14 (Gambar 5.14.a, Gambar .5.14.b, Gambar 5.14.c) merupakan seri pengamatan salahsatu subyek perlakuan crgan ginjal. Gambar 5.14.a tampak tubulus kontortus ginjal tak terjadi pembengkakan, serta tak terjadi penyempitan pada lumen tubus. Gambar 5.14.b menunjukkan sel epitel dinding lumen tubulus tak mengalami pembengkakan terutama di daerah sitoplasma. Gambar 5.14.c tampak ruang antara kapsula Bowman dan bagian kortikomedula tak membesar. Gambar 5.15 dan Gambar 5.16 merupakan gambar organ hati dan ginjal salah satu subyek kontrol sehat dan sakit .



Gambar 5.13.a Susunan sel hati subyek perlakuan dalam segi tiga Kiernan dan vena sentralis (100x)

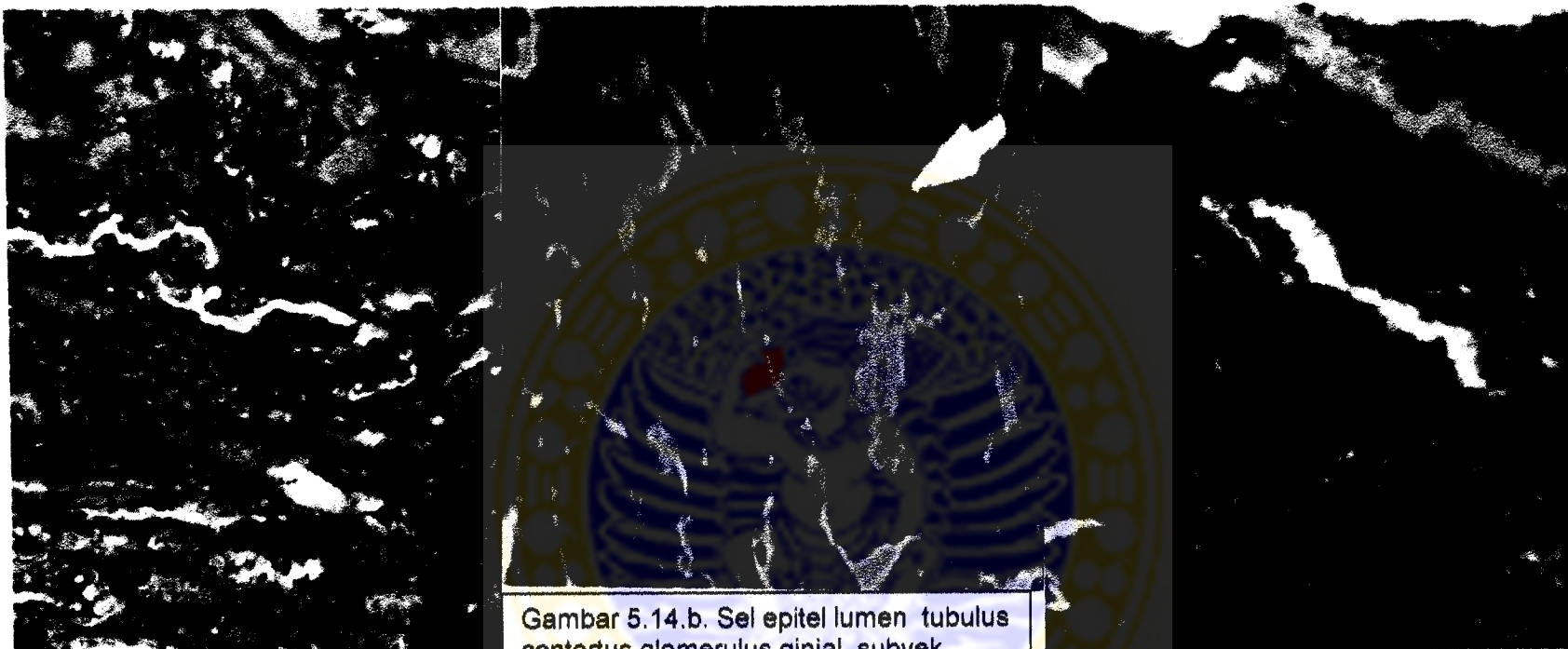


Gambar 5.13.b Susunan radier sel hati subyek perlakuan (200x)



Gambar 5.13.c Sel hati subyek perlakuan (400x)

Gambar 5.13. Seri gambar histopatologi organ hati

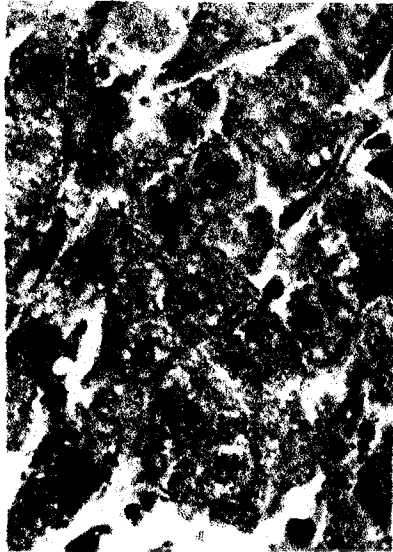


Gambar 5.14.a. Tubulus contortus glomerulus ginjal subyek perlakuan (200x)

Gambar 5.14.b. Sel epitel lumen tubulus contortus glomerulus ginjal subyek perlakuan tak terjadi pembengkakan. Lumen tubulus tak terjadi penyempitan. Kapsula Bowman tak terdapat daerah melebar (400x)

Gambar 5.14.c. Ruang antara Kapsula Bowman glomerulus ginjal subyek perlakuan (200x)

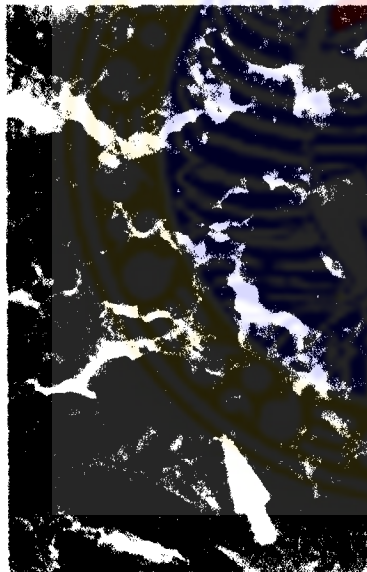
Gambar 5.14. Seri gambar histopatologi organ ginjal



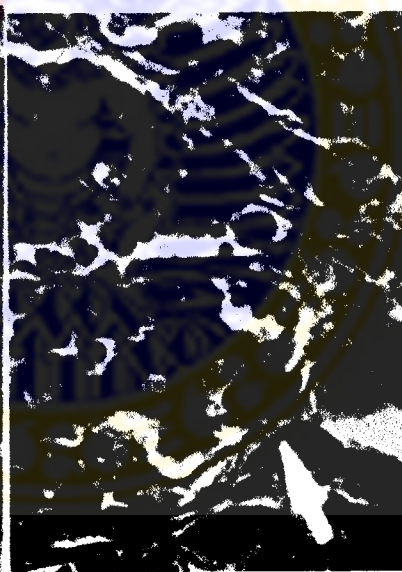
Gambar 5.15a Degenerasi melempak sel hati kontrol sakit (400x). Sitoplasma sel terdapat *vacoula* lemak. Inti sel terdesak *vacoula* lemak



Gambar 5.15b Pengkerutan glomerulus ginjal kontrol sakit (400x). Dinding sel epitel tubulus contortus sebagian karyolisis



Gambar 5.16.a Sel hati kontrol sehat (400x)



Gambar 5.16.b Batas Kapsula Bowman ginjal kontrol sehat (400x)

Gambar 5.15 dan Gambar 5.16. Gambaran histopatologi organ ginjal dan hati subyek kontrol sakit dan kontrol sehat.

5.3.4 Studi perolehan waktu penjagaan kadar

Hasil studi praperlakuan pemeriksaan kimia klinik (SGPT, SGOT, Kreatinin dan BUN) tampak seperti pada Tabel 5.25.

Tabel 5.25 Pemeriksaan kimia klinik praperlakuan subyek pemberian berulang

Kode Subyek	SGPT (U/L)	SGOT (U/L)	Kreatinin (mg/dl)	BUN (mg/dl)	BB (Kg)	Tempat pemeriksaan
Sakit-1	20,0	115	0,90	19,20	29	RSD.Dr.Soetomo
Sakit-2	21,0	116	0,70	18,10	29	RSD.Dr.Soetomo
Sakit-3	21,0	104	0,80	27,90	27	RSD.Dr.Soetomo
Sakit-4	37,0	225	0,70	34,60	23	RSD.Dr.Soetomo
Sakit-5	31,0	136	2,10	30,20	26	RSD.Dr.Soetomo
Sehat-1	37,0	297	2,60	16,92	27	RSD.Dr.Soetomo
Sehat-2	36,0	256	2,50	19,66	26	RSD.Dr.Soetomo
Sehat-3	49,0	213	2,70	8,23	27	RSD.Dr.Soetomo
Sehat-4	30,0	206	2,50	9,72	27	RSD.Dr.Soetomo
Sehat-5	11,0	162	2,20	11,30	24	RSD.Dr.Soetomo
Rerata	29,3 ± 11,1	193 ± 69,85	1,77 ± 0,9	19,60 ± 8,9		[†] Blood <i>et al.</i> , (1986)
Normal	s/d 50	s/d 307±43 [†]	s/d 2,7 [†]	8-35 [†]		[‡] Duncan, Prass (1986)

Hasil penelitian menunjukkan rerata waktu penjagaan kadar terapi agar kadar obat dalam darah \geq kadar batas terapi (13,29 $\mu\text{g/ml}$) dapat dicapai lebih dari satu hari. Rerata perolehan waktu penjagaan pada kelompok perlakuan $4,193 \pm 1,8$ hari, sedangkan pada kelompok kontrol rerata $4,4 \pm 1,9$ hari (Lampiran 32 hingga Lampiran 41). Hasil uji hipotesis perolehan kadar diminazen aseturat pemberian berulang menunjukkan terdapat kesamaan perolehan waktu penjagaan di atas batas kadar terapi antar subyek ($p > 0,05$, Tabel 5.26, Lampiran 42).

Secara kelompok (kambing perlakuan dan kontrol) perolehan kadar dikaitkan dengan lamanya penjagaan kadar (menit) \geq batas kadar terapi tampak pada Gambar 5.17 dan Gambar 5.18. Keberadaan obat pada bagian tubuh setiap waktu (*means residence time*) kelompok subyek sakit, rerata $10,68 \pm 4,19$ hari. Sedangkan keberadaan obat pada bagian tubuh setiap waktu kelompok kontrol rerata $10,48 \pm 2,47$ hari.

Tabel 5.26. Uji hipotesis perolehan waktu penjagaan kadar \geq batas kadar terapi

No.	Perolehan \geq kadar batas terapi	
	Perlakuan (hari)	Kontrol (hari)
1.	4,260 ^a	4,410 ^b
2.	2,200 ^a	2,300 ^b
3.	3,910 ^a	1,750 ^b
4.	5,019 ^a	5,020 ^b
5.	5,719 ^a	5,030 ^b
Rerata	$4,218 \pm 1,3$	$3,702 \pm 1,6$

Superskrip sama pada kolom berbeda, tak berbeda nyata $P > 0,05$ (Lampiran 42)

Lebih lanjut hasil perolehan kadar (C_p) setiap waktu tertentu (t) pada pemberian berulang kelompok perlakuan tampak pada Tabel 5.27 (Gambar 5.17) sedangkan kelompok kontrol seperti tampak pada Tabel 5.28 (Gambar 5.18).

Tabel 5.27 Perolehan kadar pemberian berulang kelompok perlakuan

Waktu (menit)	Sakit-1 (ug/ml)	Sakit-2 (ug/ml)	Sakit-3 (ug/ml)	Sakit-4 (ug/ml)	Sakit-5 (ug/ml)
0	0	0	0	0	0
5	15,877				
6			20,912	20,840	
12			31,117		35,810
13		23,796		28,150	
15					39,816
21		31,225			
30	32,163				
33			39,626		
34		33,839			
35	38,596				
36				34,564	
37					40,592
50			41,008		44,020
52	45,658				
53		57,790			
58				41,813	
67	51,002				
71		60,221			
78					51,642
81			58,994		
85				46,689	
89					60,957
92	77,695				
102		71,872			
106	76,944		60,585		
109				55,746	
111		77,507			
120					62,179
122	82,880		51,337		
124		82,690			
125				66,799	67,095
130					62,841
135			87,438		53,53
136				57,863	
142					39,233
148				65,871	
149			65,444		
151	45,151				
155		62,386			33,457
161			56,194		
162				67,503	
164					29,154
165	51,073				

Dilanjutkan

Lanjutan

166			65,349		
169		88,530			
171				42,130	
180	79,595	83,068			
182			52,632		
185				33,760	
200	52,396				
208				32,749	
202		47,808			
203			50,347		
211	40,587	34,020			
215					27,719
230					26,107
231	34,686	22,477			
234			46,698		
236				22,505	
247					24,159
252				21,428	
254			40,137		
259		19,358			
261	28,348				
294			32,989		
296				17,594	
304	26,801	16,382			
360	23,446				
362		13,608			
369			30,415		
417					21,502
685					20,638
807		13,533			
815	22,535				
1192				16,661	
1209			22,501		
1440					19,913
1444			19,187		
1456				16,201	
1510	19,142				
2238		12,928			
4290	15,918				
4297		12,559			
4321			14,755		
4331				15,560	
5775					18,032
7175					13,370
7185				15,514	
7186			10,646		
7330	11,343				
7333		10,161			
10055					12,300
10084			8,069		

Dilanjutkan

Lanjutan

10101				10,585	
10130	9,932				
10152		10,012			

**Tabel 5.28 Perolehan kadar pemberian berulang
Kelompok kontrol**

Waktu (menit)	Sehat-1 (ug/ml)	Sehat-2 (ug/ml)	Sehat-3 (ug/ml)	Sehat-4 (ug/ml)	Sehat-5 (ug/ml)
0	0	0	0	0	0
5	17,597	17,990			
6			21,669		
8					28,722
10	27,927				
11				20,426	
12	30,442				
13		27,927	26,320		
15				31,987	
16					34,755
20		38,090			
21	34,928		32,543		
25		38,422			
26	35,881				
28			34,410		
30					
40				36,328	38,702
45	42,923	45,239			
47			40,319		
52					57,737
55				49,253	
65		52,256			
66	43,495		53,514		
70				51,743	
77					71,003
81	54,750				
87		56,188	55,066		
90				72,287	
95	66,468				
97					69,549
98		57,668		57,780	
100			61,705		
104		61,690			
106	64,296		66,207	69,257	46,199
114					70,555
121		55,607	67,136		
122	56,856				
126	57,014	70,349	69,186		

Dilanjutkan

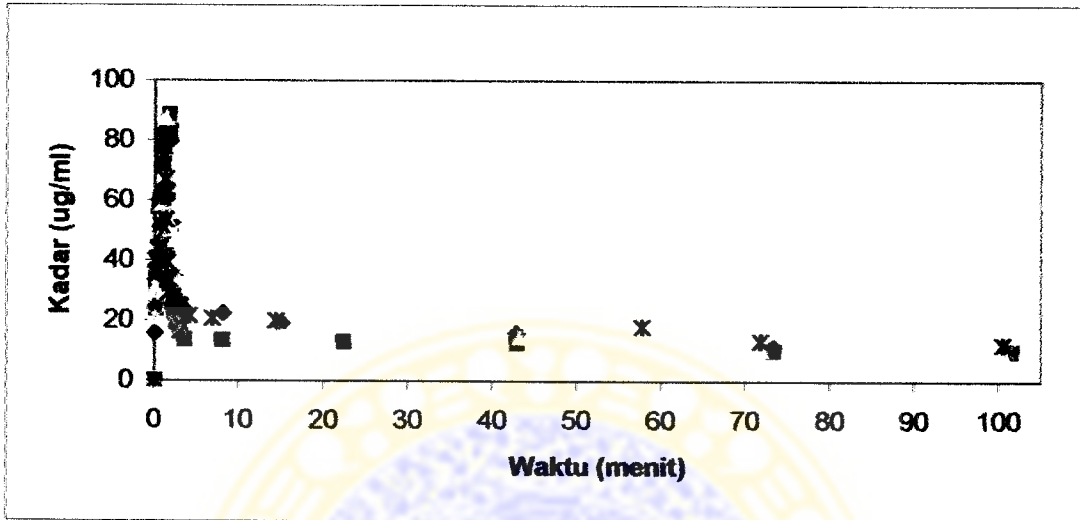
Lanjutan

129				79,002	
130			71,336		
132	70,573	75,025			
136					60,866
137				80,042	
143		56,105			55,955
144				38,555	
148			66,092		
149	51,725				
153					64,340
156				50,211	
164			59,210		
165	48,484	39,277			
172					42,872
175				89,822	
177	43,316				
182			58,205		
183		35,832			
184					41,383
201				51,097	
207					39,392
220		35,824			
221				48,111	
228					32,574
240	22,419		55,533		
243		24,279			
251				40,956	
260					29,541
629		18,649			
630	20,695				
631			32,139		
705				32,224	
715					20,985
720				28,819	
850			22,320		
1466			13,628		
1470				22,134	
1480					17,279
1567	19,471				
1568		12,767			
4255				20,538	
4265					15,769
4320			12,568		
4340	13,818				
4343		11,843			
7170					14,986
7175				17,390	
7205		10,001	9,993		
10033			8,362		
10040	9,967				

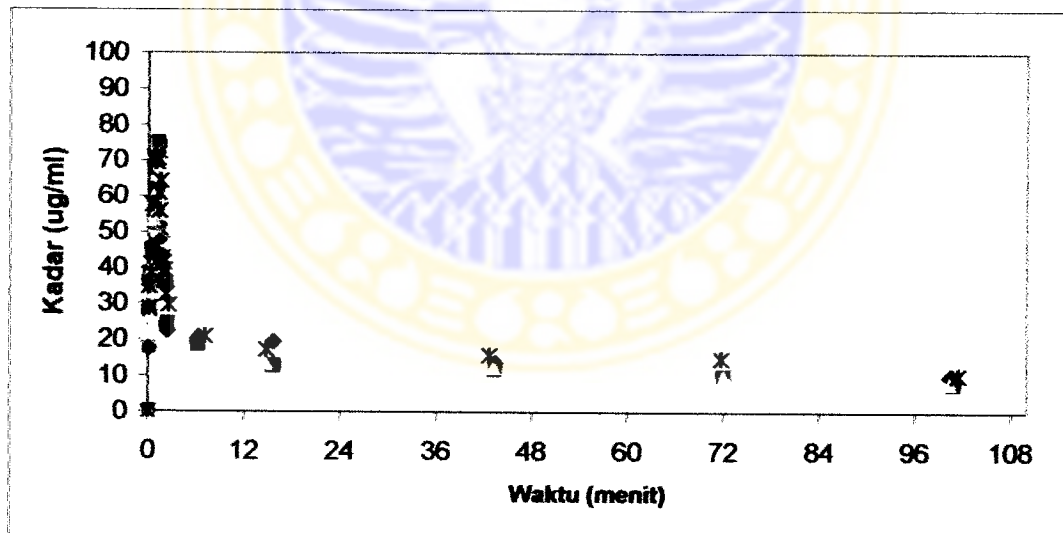
Dilanjutkan

Lanjutan

10080		7,939			
10135				12,338	
10143					10,327



Gambar 5.17 Kadar penjaan diminazen aseturat pemberian berulang pada kelompok kambing penderita tripanosomiasis



Gambar 5.18 Kadar penjaan diminazen aseturat pemberian berulang pada kelompok kambing kontrol

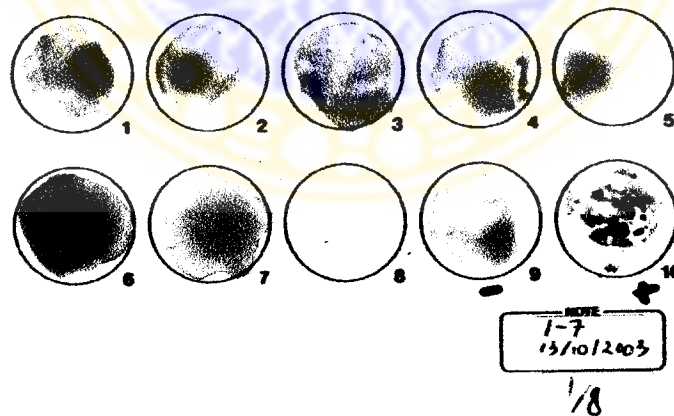
5.3.5 Pemeriksaan seroparasitologi (CATT)

Hasil uji CATT menunjukkan 7 ekor subyek perlakuan pasca uji tripanosidal setelah dilakukan pemeriksaan seroparasitologi pada pengenceran 1/4 kali dan 1/8 kali, tak ditemukan bentuk seropositif ($p < 0,05$, Lampiran 43). Hasil pemeriksaan lebih lanjut dapat diikuti pada Tabel 5.29, dengan gambaran tampak pada Gambar 5.19.

Tabel 5.29 Hasil uji card agglutination

Kode Kambing	Pemeriksaan				1/8x Kontrol negatif		1/8x Kontrol positif	
	1/4x	Skor	1/8	Skor	-	10	++ ^b	4-5
Kambing-2	-	10	-	10 ^a	-	10	++ ^b	4-5
Kambing-2	-	10	-	10 ^a	-	10	++ ^b	4-5
Kambing-3	-	10	-	10 ^a	-	10	++ ^b	4-5
Kambing-4	-	10	-	10 ^a	-	10	++ ^b	4-5
Kambing-5	-	10	-	10 ^a	-	10	++ ^b	4-5
Kambing-6	-	10	-	10 ^a	-	10	++ ^b	4-5
Kambing-7	-	10	-	10 ^a	-	10	++ ^b	4-5

- : Seronegatif, + : Seropositif, Superskrip sama pada kolom berbeda, berbeda nyata pada $p < 0,05$, (Lampiran 43).



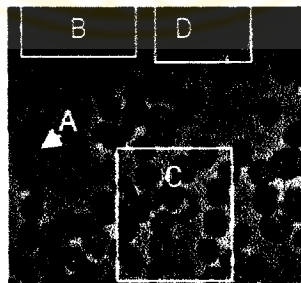
Gambar 5.19. Uji Card agglutination serum darah kambing penderita *T. evansi* isolat Bangkalan pasca pengobatan diminazen aseturat pemberian berulang. Lingkaran no. 1 hingga no. 7 mengandung serum subyek tertular pengenceran 1/8x, lingkaran no. 9 wakil kontrol negatif pengenceran 18x, lingkaran no. 10 wakil kontrol positif pengenceran 1/8x

BAB 6 PEMBAHASAN

6. 1 Preklinik (Tahap I)

6.1.1 Studi *in vitro* diminazen aseturat

Persiapan pengerjaan studi *in vitro* diketahui semua media uji (termasuk parasit dan stabilat parasit), dalam kondisi steril. Kondisi tersebut akan mendorong pertumbuhan parasit berlangsung sempurna mengingat gangguan mikroorganisme atau jamur tak didapatkan. Faktor penjagaan kondisi steril amat menentukan terhadap hasil penelitian, sebab meskipun terkontaminasi parasit tetap dapat tumbuh secara *in vitro* (Gambar 6.1). Menurut Paul (1980), dampak pertumbuhan sel eukaryot secara *in vitro* bila terkontaminasi kuman atau jamur akan menimbulkan kompetisi. Aktivitas kompetisi tersebut dapat terjadi secara alami dengan tujuan memperebutkan zat esensial dengan pilihan kalah atau sukses.



Gambar 6.1. Kultur *in vitro* terkontaminasi jamur (400x)
 A. Eritrosit lisis, B Kontaminasi jamur, C. *T. evansi* isolat Bangkalan,
 D. Eritrosit mati (mengapung).

Aktivitas perebutan zat esensial yang sukses, akan mampu mempertahankan kehidupan sel eukaryot kendati dengan kondisi tak sehat. Namun kegagalan memperebutkan bahan esensial, akan menimbulkan kematian secara alami. Dalam pengamatan *in vitro* kematian sel ditandai dengan pengapungan di permukaan.

Hasil pemanenan parasit pada tiga ekor tikus menunjukkan jumlah *Tripanosoma* yang didapatkan lebih dari cukup ($> 3.10^4$ Trip/ml dalam 5 ml). Dengan demikian persyaratan pengisian 50 μ l media dan parasit mengandung $\geq 3.10^2$ Trip/sumuran dapat dipenuhi melalui pengenceran 10^3 kali atau 10^4 kali terhadap stok parasit 18.10^5 Trip/ml darah dan 1.10^6 Trip/ml darah (Tabel 5.1).

Hasil studi *in vitro* menunjukkan diminazen aseturat mampu bersifat tripanosidal terhadap *T. evansi* isolat Bangkalan pada paparan ≥ 24 jam. Kemampuan daya tripanosidal ditemukan di atas kadar 8,48 μ g/ml (9,5 μ g/ml), dengan demikian kadar tersebut digunakan sebagai batas kadar terapi (Tabel 5.3). Perolehan batas kadar terapi diyakini kebenarannya mengingat dalam studi *in vitro* tak dikenal fenomena *first pass effect*. Pada keadaan demikian jumlah kemoterapi tidak berkurang sedikitpun saat berinteraksi dengan target sasaran.

Temuan kadar tripanosidal diminazen aseturat secara *in vitro* relatif cukup tinggi bila dibandingkan dengan dengan temuan kadar tripanosidal suramin ($\geq 6,6$ μ g/ml). Demikian pula temuan hasil penelitian Kaminsky *et al.*, (1994) terhadap *T. congolense* yaitu

cukup diberikan diminazen aseturat $\pm 1 \mu\text{g/ml}$ paparan 6 jam. Namun temuan kadar tripanosidal diminazen aseturat tersebut relatif lebih rendah bila dibanding penelitian oleh Roostantia *et al.*, 2003 (kadar $11,5 \mu\text{g/ml}$ untuk isometamidium klorida paparan 24 jam). Perbedaan temuan hasil penelitian Kaminsky *et al.*, (1994) maupun Roostantia *et al.*, (2003) dibanding hasil penelitian ini, menunjukkan tergantung perbedaan spesies maupun jenis kemoterapi yang digunakan.

Ditinjau dari aksi farmakodinami diminazen aseturat, dikaitkan temuan kadar $\geq 8,48 \mu\text{g/ml}$, dapat disimpulkan aksi kerja sebagai tripanosidal cukup selektif. Hal tersebut disebabkan secara *in vitro* sel eukaryot disekeliling parasit dalam satu sumuran mikroplat tidak mengalami kematian. Sel eukaryot disekeliling parasit tersebut juga diketahui memiliki asam inti dengan unsur ikatan Adenin-Timin dan merupakan sasaran aksi diminazen aseturat.

Pada Gambar 5.1a tampak beberapa sel eukaryot (eritrosit) disekeliling parasit *Tripanosoma* masih terlihat segar. Bila dalam satu sumuran mikroplat terdapat beberapa jenis sel eukaryot maka sasaran kompleksasi akan terjadi pada sel-sel eukaryot dengan kandungan A-T terbesar. Pendapat tersebut bila dikaitkan pandangan Gibson, (2003) mengenai kinetoplastid, dan pandangan De Souza (2002), tentang kandungan $\pm 20 - 25 \%$ DNA dalam kinetoplastid, dapat disimpulkan akan banyak unsur A-T dalam kinetoplastid. Perkiraan tersebut didasarkan atas analogi

diketuinya kandungan total kromosom asam inti *T. cruzi* 87 MB. Dengan demikian daerah kinetoplastid diperkirakan mengandung kromosom asam inti 17,4-21,75 MB. Bila diketahui satu untai pasangan asam inti mengandung 1440 pasangan basa (termasuk sebagian ikatan A-T), maka akan terdapat trilyunan unsur A-T dalam 17,4-21,75 MB kromosom asam inti. Jumlah tersebut jauh lebih besar bila dibandingkan dengan jumlah ikatan A-T sel eukaryot lain.

Tripanosoma diketahui memiliki banyak strain dan setiap strain mengandung protein permukaan dengan sifat berbeda-beda. Protein permukaan kerabat *Tripanosoma* umumnya mengandung *glycosyl phosphatidyl inositol bersama 15-carbon famesyl*, serta unsur karbohidrat tambahan (Gambar 2.6). Karbohidrat tambahan protein permukaan *T. evansi* hingga saat ini masih belum diketahui. Namun isolat Kulon Progo (Yogyakarta) 1.10^9 Trip/ml secara eksperimental dapat diluluhkan menggunakan pelarut 1/10 volume *lysiscocktail* (Artama, 1992). Variabilitas unsur karbohidrat tambahan protein permukaan memberikan kontribusi perbedaan perolehan harga kadar tripanosidal antara hasil penelitian ($\geq 8,48 \mu\text{g/ml}$) dengan laporan Kaminsky *et al.*, (1994).

Protein permukaan parasit (termasuk karbohidrat tambahan) merupakan penghalang utama obat untuk masuk melewati mikrotubulus subpelikular parasit. Bila karbohidrat tambahan di daerah variasi protein permukaan dapat terikat dengan obat, maka

melalui mikrotubulus subpelikular obat akan tersalurkan ke sitosol. Bila diminazen aseturat mampu mencapai sitosol, dengan mudah akan mampu mengganggu aktifitas glikolisis parasit melalui kompetisi pengikatan O₂ terutama di AMSH (Gambar 2.5).

Hasil analisis rerata perbedaan dua pasangan dengan kontrol kemoterapi (suramin), menunjukkan diminazen aseturat menghasilkan daya tripanosidal kendati membutuhkan dosis tinggi (Lampiran 7). Dosis tinggi dimaksudkan adalah berlaku untuk jenis *T. evansi* isolat Bangkalan (salah satu isolat terganas penimbul wabah di Indonesia).

Tinjauan seri Gambar 5.1a hingga Gambar 5.1c menunjukkan banyak ditemukan adanya latar belakang eritrosit segar (bagian tengah cekung) yang tersisa ikut dalam penanaman. Keadaan tersebut dapat digunakan sebagai indikator bahwa kondisi media sangat cocok untuk pertumbuhan sel lain serta tetap steril. Seandainya terjadi kontaminasi jamur, kuman ataupun virus maka sel darah merah berangsur-angsur mati dan pada akhir inkubasi tak terlihat pada latar belakang seri Gambar 5.1a hingga Gambar 5.1c. Sisa destruksi sel eukaryot yang mati akan meracuni media pertumbuhan dan berpengaruh terhadap metabolisme *Tripanosoma*. Implikasi lebih lanjut adalah mendorong percepatan kematian *Tripanosoma*. Pada keadaan demikian akan terjadi kerancuan hasil apakah kematian *Tripanosoma* karena kontaminasi sumuran mikroplat atau karena aktivitas farmakodinami.

6.1.2 Uji antigenitas

Dalam pelaksanaan uji antigenitas tetap melakukan prinsip kehati-hatian seperti ketentuan *Advisor Committee on Dangerous Pathogen* dalam memperlakukan kambing tertular (Keddie, 1990). Prinsip kehati-hatian terutama ditujukan untuk menjaga kemungkinan adanya letupan wabah pada hewan akibat penggunaan isolat terganas.

Hasil uji antigenitas menunjukkan bahwa kambing hewan coba membutuhkan jumlah parasit relatif tinggi untuk memunculkan keadaan parasitemia. Bila menyimak Tabel 5.4 dan Tabel 5.5 menunjukkan upaya memunculkan kondisi parasitemia positif dua, diperlukan dosis kumulatif antara $23,6-32 \cdot 10^6$ Trip/ml (rerata $28,68 \cdot 10^6$ Trip/ml). Setiap ekor kambing perlakuan dibutuhkan rerata $9,56 \cdot 10^6$ Trip/ml. Jumlah tersebut identik bila dibandingkan laporan Soeharmi *et al.*, 2002, ($5-9 \cdot 10^5$ Trip/ml dua kali sehari), sehingga diperlukan stok dosis $7 \cdot 10^6 - 12,6 \cdot 10^6$ Trip/ml.

Total dosis penularan hasil penelitian bila dibanding laporan Silayo *et al.*, (1992) terkait dengan dosis total penularan *T. congolense* terhadap kambing Afrika Timur-Galla, menunjukkan kesamaan. Dinyatakan pula dibutuhkan $5 \cdot 10^5$ Trip/ml setiap kali penularan setiap hari selama 14 hari ($7 \cdot 10^6$ Trip/ml), dan parasitemia akan muncul beberapa hari hingga satu bulan pasca penularan.

Tindakan infeksi parasit *Tripanosoma* pada kambing bila dilakukan secara alami, membutuhkan waktu penularan cukup lama dan harus dilakukan infeksi setiap minggu (Beally *et al.*, 1996). Anak sapi Boran belum lepas susu ditulari *T. congolense*, membutuhkan dosis $5 \cdot 10^3$ atau $5 \cdot 10^5$ Trip/ml agar timbul parasitemia. Dosis tersebut diketahui hanya untuk menciptakan timbulnya antibodi spesifik (Peregrine *et al.*, 1998). Sedangkan sapi 24 bulan untuk mendapatkan kondisi antitripanosoma *T. congolense* memerlukan dosis $5 \cdot 10^2$ - $5 \cdot 10^5$ Trip/ml (Whitelaw *et al.*, 1986). Uraian tersebut menunjukkan tingginya kebutuhan dosis berhubungan linier dengan besarnya postur hewan yang digunakan.

Ditinjau dari kepekaan kambing sebagai media *T. evansi*, menunjukkan hewan tersebut kurang peka dibanding berturut-turut seperti mencit dan tikus, atau anjing, kuda, sapi, unta serta kerbau. Kelompok kedua yang termasuk kurang peka yaitu kelinci biri-biri, domba, kambing.

Antibodi *T. brucei* isolat s 427 klon 1 dan 2 dapat ditemukan pada tubuh 22 spesies mamalia non primata seperti singa, gorila, zebra, kucing liar dan domestik (Black *et al.*, 1999). Dengan demikian menunjukkan kepekaan hewan mamalia nonprimata menerima infeksi *T. brucei* tergantung komponen antibodi ditubuh hewan masing-masing.

Upaya untuk menjadikan domba sebagai hewan coba kurang peka menjadi lebih peka terhadap *T. evansi*, pernah dilaporkan dengan melakukan pengambilan paksa organ limpa (Wardiarto, 1983). Namun dalam perjalanan waktu cara tersebut tak banyak diikuti, mengingat pertimbangan kemunculan disfungsi fisiologis dengan dampak akhir kematian. Upaya lain peningkatan hewan coba kurang peka menjadi lebih peka adalah dengan melakukan adaptasi parasit *Tripanosoma* secara berkelanjutan. Sebagai contoh adalah penumbuhan *T. evansi* dalam tubuh marmut atau kelinci. Dalam tubuh kelinci *T. evansi* dapat berkembang antara 3-4 bulan dan diakhiri kematian. Tindakan adaptasi secara berkelanjutan akan dapat meningkatkan kecepatan perkembangbiakan parasit, sehingga kelinci akan mati 2-3 bulan pasca penularan.

Hasil analisis perbedaan dua kelompok kambing (kambing perlakuan dan kambing kontrol) menunjukkan kambing adaptif untuk parasit *T. evansi* isolat Bangkalan (Tabel 5.4, Lampiran 8)

Pada seri Gambar 5.2a hingga Gambar 5.2c menunjukkan aksis dosis penularan $20 \cdot 10^6$ Trip/ml hingga $35 \cdot 10^6$ Trip/ml mulai memunculkan kondisi parasitemia positif satu. Kemunculan parasitemia positif satu dimulai pada hari ke enam dan pada hari ketujuh akan ditemui kondisi parasitemia positif dua.

Analisis hasil pemeriksaan Hb secara sahli pra uji antigenitas menunjukkan kambing keperluan uji memiliki Hb normal. Catatan

Hb normal kambing menurut *Merck Veterinary Manual* (2003) antara rentang 8-15 g%. Pada pemeriksaan Hb model Sahli secara empirik kemampuan pengamatan membedakan warna memiliki deviasi $\pm 10\%$. Pada keadaan demikian kisaran harga normal menjadi $7,2 \pm 8,8$ g% hingga $13,5 \pm 16,5$ g%. Bila nilai rentang tersebut dijadikan kisaran kenormalan, maka Hb kambing perlakuan (Tabel 5.4) pada hari ke 7 (parasitemia ++), masih tergolong normal. Namun bila diperhatikan pada kelompok perlakuan sebelum dan saat kemunculan parasitemia, tampak adanya kecenderungan penurunan.

6.1.3 Optimasi dan validasi KCKT

Optimasi didasarkan atas pertimbangan protokol kerja pembaharuan milik Gummow *et al.*, (1995), sedangkan protokol kerja sebelum diperbaharui dari Gummow (1993), digunakan perbandingan. Protokol penetapan analit dalam plasma versi Gummow *et al.*, (1995) diterapkan dengan modifikasi kecil sehingga disesuaikan dengan ketersediaanya peralatan di laboratorium kerja. Bentuk modifikasi yang dimaksudkan adalah penggantian jenis KCKT dari tipe HP 1050 *Variable Wave Length Detector* (VWD) dengan tipe lebih baru yaitu HP 1100 namun tetap menggunakan detektor sejenis (VWD). Modifikasi lain adalah model kolom Nova-Pak C18 Radial-pak *cartridges peek*, 5 mm x10 cm serta asesori RCM 8 x10' *cartridge holder* diganti dengan Agilent *steinless steel*

body Zorbax ODS (C18) 4,6 x 250 mm (ϕ 5 μ m). Modifikasi tambahan lain adalah pengaturan keasaman eluen fase mobil diatur pH 5,5 dan tak menggunakan baku internal.

Tinjauan Tabel 5.7 mengenai hasil pengerjaan validasi menunjukkan nilai rerata % harga perolehan kembali serta rerata % koefisien variasi presisi masih dalam batas rentang ketentuan uraian Hartmann *et al.*, 1994 (*recovery* antara 80-120 % dengan % KV presisi sampai dengan rentang 10-20 %).

Analisis linieritas serial kadar 0,26 μ g/ml hingga 2,32 μ g/ml dalam plasma terhadap rerata area kromatogram, mengandung arti trayek kelurusan memiliki variasi kurang dari 2%. Bahkan menurut Funk *et al.*, (1992), dalam matrik biologi ditoleransi hingga 5 %. Perolehan korelasi antara serial kadar dengan area kromatogram $r^2 = 0.99$, juga didapatkan oleh Aliu dan Ødegaard (1983); Gummow *et al.*, (1995) dan Mamman *et al.*, (1996).

Tinjauan perolehan batas deteksi dan batas kuantifikasi dibandingkan temuan Gummow *et al.*, (1995) tergolong cukup peka. Temuan batas deteksi, batas kuantifikasi hasil laporan Gummow *et al.*, 1995 adalah 2 ng dan 10 ng, sedangkan hasil penelitian adalah 1,1 ng dan 3,2 ng.

6.1.4 Perwatakan kinetik dosis tunggal

Hasil uji praperlakuan Tabel 5.9, menunjukkan harga SGPT, SGOT Kreatinin, BUN dan Hb masih dalam rentang normal.

Keadaan tersebut menunjukkan ke 10 kambing praperlakuan siap menanggapi dinamika obat. Kesiapan menanggapi dimaksudkan adalah secara faali komponen tubuh yang berinteraksi langsung dengan obat, beraktivitas normal, serta diyakini memiliki keseragaman dalam proses kerja.

Selama penelitian berlangsung dilakukan penanganan hewan sesuai konsep kesejahteraan hewan seperti anjuran Pengurus Besar Perhimpunan Dokter Hewan Indonesia (2003). Hal tersebut dimaksudkan untuk memperlakukan hewan hanya keperluan ilmiah tanpa mengurangi hak bebas rasa takut, lapar - haus, serta sakit dan penyiksaan. Pada keadaan demikian akan menghasilkan hasil penelitian dengan keluaran alamiah tanpa dipengaruhi unsur stresor internal (seperti antihistamin, bradikinin, serotonin).

Dalam studi perwatakan kinetik diminazen aseturat dalam tubuh kambing tertular maupun sehat, pilihan yang digunakan adalah model dua kompartemen terbuka ekstrasvaskular. Cara tersebut juga digunakan dalam mempelajari perwatakan kinetik diminazen aseturat pada temak jenis ruminan (Gummow *et al.*, 1995 dan Paramjit *et al.*, 2002).

Ditinjau dari nilai Informasi Kriteria Akaike (AIC) menunjukkan harga rerata kambing tertular = $85,3 \pm 25,97$ sedangkan kambing sehat = $69,4 \pm 11,1$. Nilai tersebut merupakan harga minimum rerata antar kelompok hasil perhitungan dari setiap kambing individu dan sangat sesuai untuk model dua kompartemental

terbuka ekstrasvaskular. Tinjauan pengujian pilihan dua kompartemen melalui analisis $K1+K2 < 20.K13$ menunjukkan persyaratan tersebut hanya berlaku pada beberapa kambing (K1,K8,K9,K10), sedang sisanya berharga sedikit di atas atau sama dengan 20.K3. Fakta tersebut menunjukkan pilihan dua kompartemen dapat dilakukan.

Hasil analisis perwatakan kinetik diminazen aseturat pemberian tunggal pada kambing menunjukkan harga parameter bervariasi antar kelompok. Variasi harga parameter kinetik dimaksudkan adalah pada fase absorpsi parameter kinetik K_a (menit^{-1}) pada kelompok tertular rerata lebih kecil 0,764 % dari parameter kinetik K_a (menit^{-1}) kelompok kontrol (Tabel 5.12, Lampiran 21.1 $P < 0,05$). Demikian pula tetapan α kelompok tertular lebih besar 0,008 % dibanding tetapan α kelompok kontrol (Tabel 5.12, Lampiran 21.2, $p > 0,05$). Parameter kinetik T_{maks} kelompok tertular lebih besar 25,75 % dibanding kelompok kontrol (Tabel 5.12, Lampiran 21.3, $p > 0,05$). Namun parameter kinetik C_{maks} kelompok tertular lebih kecil 15,98 % dibanding C_{maks} pada kelompok tertular (Tabel 5.12, Lampiran 21.4, $p < 0,05$). Sedangkan harga volume distribusi kelompok tertular lebih besar 0,63 % dibanding harga volume distribusi kelompok kontrol (Tabel 5.12, Lampiran 21.5, $p > 0,05$). Sedangkan parameter waktu paruh eliminasi kelompok tertular lebih besar 22,86 % dibanding parameter waktu paruh eliminasi kelompok kontrol (Tabel 5.12, Lampiran 21.6, $p > 0,05$). Parameter

kinetik klirens kelompok tertular lebih besar 12,64 % dibanding harga klirens kelompok kontrol (Tabel 5.12, Lampiran 21.7, $p < 0,05$). Harga AUC kelompok kambing lebih kecil dibanding kelompok kontrol, dan hal tersebut menunjukkan penyebaran obat di dalam tubuh memiliki perbedaan kedalaman (Tabel 5.12, Lampiran 21.8, $p < 0,05$).

Tinjau perolehan kadar observasi (C_p) antara kedua kelompok perlakuan, secara umum menunjukkan bahwa empat diantara lima kambing kelompok tertular (K6,K7,K8,K10) rerata menghasilkan kadar lebih rendah dibandingkan kelompok kontrol. Khusus pada kambing K9 salahsatu dari kelompok tertular ternyata memiliki perolehan harga rerata kadar obsevasi setiap waktu sama dengan kelompok kontrol (Lampiran 19, Lampiran 20).

Rendahnya kadar observasi pada kambing penderita tripanosomiasis juga dinyatakan oleh Paramjit *et al.*, (2002) dalam penelitiannya menggunakan hewan coba kambing dengan *T. evansi* isolat India. Fenomena rendahnya kadar penderita tripanosomiasis tersebut juga ditemui pada tikus yang terinfeksi dengan parasit *T. evansi* isolat Bangkalan (Lazuardi, 1994).

Uraian rendahnya perolehan kadar observasi kelompok tertular bila dikaitkan hasil laporan Lazuardi (1994) dan Paramjit *et al.*, (2002), diperkirakan merupakan tanda khas terhadap kasus tripanosomiasis. Bila ditinjau implikasi klinik pada semua kasus tripanosomiasis (baik manusia maupun hewan), pada dasarnya

menghasilkan penyerangan pada sistem haemopoetik dilanjutkan sistem persyarafan induk semang. Dalam penyerangan pada sistem haemopoetik induk semang manifestasi utama yang dirasakan adanya tanda menuju ke gejala anemia. Sebagai tanda awal salahsatunya adalah penurunan nilai Hb seperti contoh konkrit kambing perlakuan Tabel 5.4. Pada kondisi demikian akan terjadi penurunan jumlah makromolekul, dengan dampak penurunan jumlah obat yang terikat dengan makromolekul (termasuk saat fase distribusi). Bila keadaan tersebut terjadi secara berkepanjangan maka jumlah obat yang terdistribusi akan berkurang. Gambaran faktor tersebut di atas merupakan salahsatu penyebab adanya fenomena penurunan parameter kinetik.

Kemunculan anemi dalam kasus tripanosomiasis diperkirakan akibat adanya kompetisi penggunaan O₂ dalam aliran darah antara *Tripanosoma* dan sel tubuh induk semang terutama sel darah merah. Clarkson *et al.*, (1989) menyatakan satu parasit *Tripanosoma* membutuhkan O₂ 50 kali lebih besar dibanding sel eukaryot induk semang. Mengingat unsur O₂ diseluruh tubuh secara merata banyak ditemukan di aliran darah, maka predileksi parasit tersebut di aliran darah (Opperdoes, Michels, 2001).

Keberadaan parasit dalam aliran darah banyak ditemukan pada aliran darah percabangan buluh darah besar atau atau dekat dengan aliran darah sentral. Keadaan tersebut disebabkan masih tingginya kandungan O₂ dibanding kandungan pada buluh darah

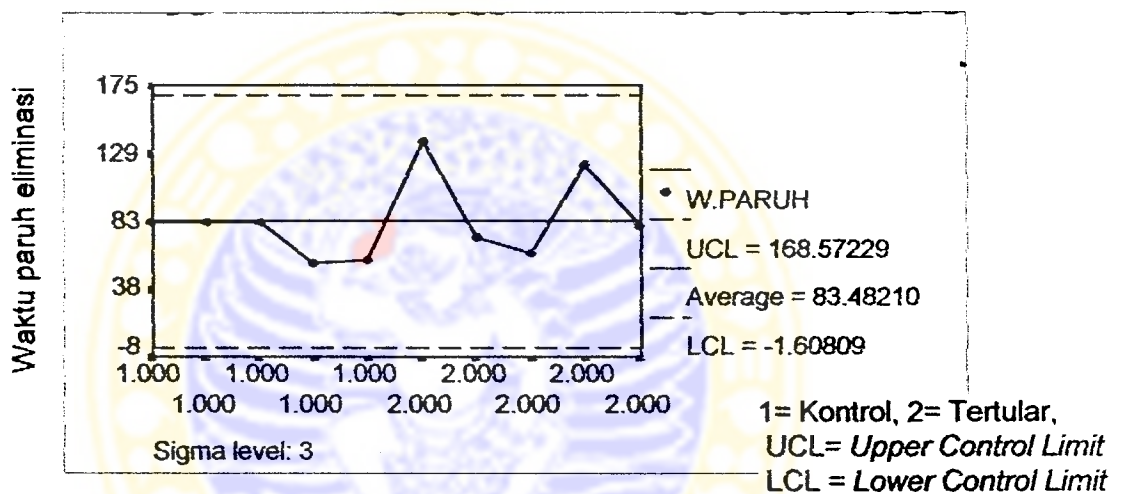
perifer. Fenomena tersebut menjadikan kerabat *Tripanosoma* diidentifikasi sebagai parasit darah aerobik.

Tinjauan perolehan kadar tripanosidal pada kasus tripanosidal amat menentukan keberhasilan pengobatan kendati tak mudah di dapat mengingat adanya sindroma terhadap sistem haemopoetik. Mengamati hasil perolehan kadar observasi setiap waktu individu kambing tertular (K6-K10) dibandingkan kambing kontrol (K1-K5), maka kemungkinan diperoleh kadar tripanosidal masih memungkinkan (Lampiran 9 dan Lampiran 18). Pertimbangan tersebut didasarkan indikasi perolehan kadar puncak observasi salahsatu dari kelompok tertular (K9) masih dalam rentang kadar puncak kelompok sehat. Fenomena tersebut merupakan indikasi bahwa kemunculan sindroma sistem haemopetik, dimungkinkan didapatkannya kecukupan kadar pada kambing sehat.

Tinjauan perilaku polimorfisme interspesies terhadap kemampuan eliminasi diminazen aseturat dalam tubuh kambing pasca pengobatan penderita tertular maupun sehat, menunjukkan adanya pola bimodal. Modal I tampak terkumpul pada 82, 67 jam⁻¹ pada frekuensi terbanyak dibanding disekitarnya = 5 kambing, sedangkan modal II pada 131 jam⁻¹ pada frekuensi dibanding disekitarnya = 1 kambing (Gambar 5.8).

Pada Gambar 6.2 dapat diperhatikan individu hewan coba dengan harga waktu paruh dekat dengan rentang rerata atau lebih besar dari rerata. Pada kelompok tertular tampak terdapat dua

kambing (K6-K9) memiliki harga waktu paruh besar ($138,5 \text{ jam}^{-1}$ dan $121,451 \text{ jam}^{-1}$). Namun salahsatu dari dua kambing (K9) dengan harga waktu paruh besar ($121,451 \text{ jam}^{-1}$) masih termasuk dalam distribusi normal kelompok modal I (Klas no. 4, Lampiran 22). Dengan demikian hanya terdapat satu kambing (K6) dalam satu kumpulan hewan studi kinetik dosis tunggal memiliki harga waktu paruh ($138,5 \text{ jam}^{-1}$) diluar modal I.



Gambar 6.2. Grafik kontrol harga waktu paruh seluruh individu kambing studi perwatakan kinetik diminazen aseturat dosis tunggal.

Bila ditinjau dari Gambar 5.8 serta Lampiran 22, maka frekuensi disekeliling individu kambing dengan harga waktu paruh eliminasi terbesar (K6) adalah nihil. Sehingga individu kambing dengan waktu paruh terbesar (K6) kemungkinan perwakilan di luar modal I (modal II).

Modal I merupakan kumpulan distribusi normal umumnya diminazen aseturat dalam tubuh kambing pasca pemberian, sedangkan modal II dapat terjadi akibat adanya parasitemia.

Dampak parasitemia begitu kuat sehingga pada kajian teoritik tikus tripanosomiasis pasca pengobatan suramin menghasilkan tiga modal (Lazuardi, 1997^a).

Dampak parasitemia diperkirakan mampu mempengaruhi kinerja unsur gen aotosomal dalam mengekspresikan pengendalian metabolisme (N-asetil transferase). Bila pada suatu populasi kambing termasuk modal I mengandung gen aotosomal dominan maupun resesif dalam mengekspresikan enzim metabolisme (N-asetil transferase), maka keadaan tersebut tak menjadi persoalan dalam strategi pengobatan. Namun bila salah satu individu dalam populasi modal II mengandung gen aotosomal dominan, maka dapat dilakukan rejeksi dari kumpulan populasi. Tindakan rejeksi untuk menjaga agar dalam satu populasi tetap memiliki pola distribusi normal, sehingga memudahkan dalam upaya pengobatan tripanosomiasis. Tetapi bila salahsatu kambing termasuk pada modal II mengandung gen aotosomal resesif dan hidup pada populasi sama, maka akan sukar dilakukan rejeksi. Seandainya kambing modal II dengan gen aotosomal resesif melakukan perkawinan, maka akan menghasilkan banyak turunan terdiri baik gen aotosomal dominan maupun resesif. Sehingga akan terbentuk lebih dari satu modal secara permanen dalam spesies satu hewan akan makin mempersulit strategi pengobatan.

Kemunculan sekumpulan populasi aotosomal dominan dengan penyimpangan fenotip seperti respon eksitasi akibat pemberian

asetosal pada kucing (Pope, Baggot, 1983), dapat dengan mudah dikenali. Tetapi keberadaan populasi autosomal resesif dengan penyimpangan fenotip seperti uraian Oliver (1987) mengenai perilaku tak umum pada anjing (agresif), maka penggunaan dosis lazim akan menyulitkan.

Jumlah kambing autosomal resesif dengan potensi penyimpangan fenotip, pada hewan secara teoritik dapat dihilangkan. Tetapi secara empirik hal tersebut tak mudah dilakukan, dan sebagai jalan keluar adalah melakukan minimisasi jumlah hewan tertular (Kennedy, 1975).

6.1.5 Studi hubungan dosis terhadap respon tripanosidal

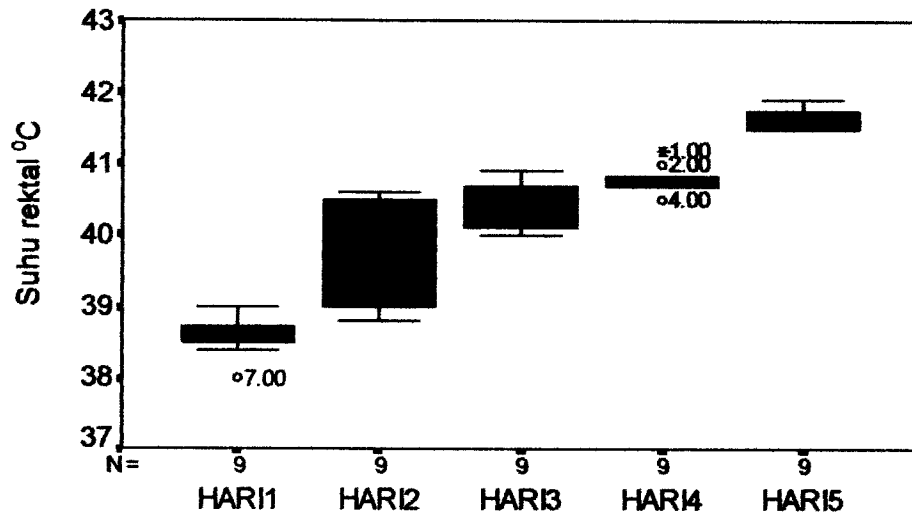
Hasil prapengerjaan pemeriksaan sebagian kimia klinik dengan hasil dalam kriteria normal (Tabel 5.13), menunjukkan secara faali organ hati dan ginjal seluruh kambing menunjukkan kesamaan fungsi. Pada keadaan demikian asumsi yang ditetapkan adalah respon dinamika obat tak dipengaruhi oleh kedua fungsi hati dan ginjal. Bila terdapat pengaruh respon dinamika obat berkaitan aktivitas fungsi fisiologis hati, ginjal selama penelitian, berlaku semua kambing.

Hasil pemeriksaan Hb prapengerjaan juga masih menghasilkan rentang harga normal (Tabel 5.13). Pada keadaan demikian menunjukkan sistem haemopoetik setiap individu secara faali memiliki kesamaan fungsi.

Tinjauan jumlah tripanosoma yang harus diberikan untuk mendapatkan kondisi parasitemia (Tabel 5.14), menunjukkan diperlukan dosis akumulasi tinggi. Sebagai ilustrasi adalah Ka-DR1 Kb-DR1 dan Kc-DR1 membutuhkan dosis akumulasi $12,98.10^8$ Trip/ml, Kf-DR2, KgDR2, Kh-DR2 membutuhkan akumulasi 16.10^8 Trip/ml, Ki-DR3, Kj-DR3, Kk-DR3 membutuhkan akumulasi $12,8.10^8$ Trip/ml. Dengan demikian rerata akumulasi untuk memunculkan kondisi parasitemia setiap kambing dibutuhkan $13,93.10^8$ Trip/ml.

Ditinjau dari hubungan antara jumlah dosis penularan Trip/ml dengan kenaikan suhu tubuh rektal setiap hari pada semua kelompok kambing, menunjukkan adanya kenaikan nyata. Dengan demikian setiap hari selama masa penularan berlangsung, terjadi perkembangan kondisi parasitemia seiring dengan kenaikan suhu tubuh (Gambar 6.3).

Menyimak organisasi protein permukaan uraian Morris *et al.*, (2002), maka komponen pirogen dengan kemampuan perangsangan pada termoregulator (Hipotalamus) merupakan protein permukaan. Seed (2001) bahkan menyatakan fenomena AVS protein permukaan dengan manifestasi variabilitas antigenik, dapat menimbulkan variabilitas pirogenitas sebagai komponen pirogen. Variabilitas pirogenitas yang terjadi akan bermanifestasi adanya ketidak seragaman kenaikan suhu tubuh setiap individu tertular.



Gambar 6.3. Hubungan antara perkembangan parasitemia dengan kenaikan suhu rektal setiap hari terhadap seluruh kambing perlakuan sebelum dilakukan pengobatan.

Dalam pengamatan hari ke lima saat timbulnya kondisi parasitemia (pasca pengobatan) lihat Tabel 5.14, menunjukkan pemberian dosis 5 dan 7 mg ternyata mampu bersifat Tripanosidal. Sedangkan pada tiga kambing dengan pemberian 3,5 mg, terdapat satu kambing hingga hari ke 52 masih dalam kondisi tertular. Demikian pula hasil pemeriksaan pada mencit mengenai kemunculan parasitemia pada salahsatu kambing tetap terjadi hingga hari ke 52, tetapi lainnya tak ditemui kondisi parasitemia (Gambar 6.4). Mengingat masa pengamatan dirasakan cukup lama, maka dapat disimpulkan bahwa dosis 5 dan 7 mg bersifat tripanosidal dibanding 3,5 mg.

Kemampuan tripanosidal diminazen aseturat pada dosis lazim 3,5 mg hingga kini masih saling silang pendapat (Van den Bossche *et al.*, 2000). Mdachi *et al.*, (1995) dan Paramjit *et al.*, (2002)

namun masih 1,2 % di atas dosis yang ditawarkan oleh Paramjit *et al.*, (2002).

Peningkatan dosis terhadap respon tripanosidal suatu saat akan bersifat tetap (*full strength*) dan hal tersebut tampak pada Gambar 5.9 pemberian 5 dan 7 mg. Pada penetapan batas daerah separuh respon tripanosidal (50 % *end point*), maka bentuk ketidakmampuan daya tripanosidal diwujudkan dengan kemunculan kembali parasit pasca pengobatan. Pada mencit keadaan kemunculan kembali dapat terjadi 5-8 hari pasca pengobatan diminazen aseturat, selanjutnya akan makin mengganas hingga mampu mematikan mencit kurang dari 3 hari. Fenomena tersebut menjadikan persoalan baru yang mendasar oleh beberapa peneliti di Departemen Parasitologi Balai Penelitian Veteriner (Jl. RE Martadinata, Bogor) perihal masa waktu pengamatan. Awal tahun 1980-an masa pengamatan dianjurkan 15 hari, dan awal tahun 1990 hingga pertengahan 1990 diganti menjadi 1 bulan, akhirnya menjadi 1,5 bulan (45 hari).

Perubahan dosis lazim pada kemoterapi antitripanosoma pada dasarnya akibat perkembangan konsep mengenai fenomena AVS yang dimiliki oleh kerabat *Tripanosoma*. Bukti nyata fenomena AVS kerabat *Tripanosoma* dalam menanggapi ancaman kemoterapi antitripanosoma, adalah adanya parasit kebal obat (Mamman *et al.*, 1995^a). Kondisi tersebut secara empirik ditemukan dilapangan dengan manifestasi alami yaitu adanya individu tertular

tripanotoleran (Urquhart *et al.*, 1994). Dalam laporan Mamman *et al.*, (1995^a) pemberian dosis berdaya tripanosidal pada mencit tertular parasit kebal obat, dapat mencapai 45 mg/kg berat badan.

Resiko kemunculan individu tripanotoleran akibat pemberian dosis subterapi dikaitkan perolehan hasil penelitian tripanosidal dosis 5 mg, menunjukkan temuan dosis 5,22 mg cukup aman. Pertimbangan keamanan tersebut adalah temuan dosis di atas sedikit dosis empirik tripanosidal (5 mg) dan dalam rentang dosis tripanosidal empirik (5-7 mg/kg berat badan).

Perbedaan dosis 220 μg (5,22 mg-5 mg) sebenarnya memiliki makna tripanosidal signifikan mengingat dalam studi *in vitro* diketahui $\leq 9,54 \mu\text{g/ml}$ mampu bersifat tripanosidal. Selisih kadar diminazen aseturat 200 μg diyakini akan memberikan kemampuan tripanosidal jauh lebih besar dibanding kadar tripanosidal hasil perolehan studi *in vitro*. Namun bila dikaitkan dengan temuan harga fraksi terabsorpsi (F_a) ekstravaskular = 0,951 (Aliu, Ødegaard 1985), maka pemberian dosis 5,22 mg akan didapatkan harga 4,96 mg di dalam tubuh (kehilangan $\pm 256 \mu\text{g}$). Nilai 4,96 mg obat dalam tubuh tetap mengandung makna lebih besar dibanding pemberian dosis 5 mg/kg berat badan. Dosis 5,22 mg/kg berat badan tidak merupakan dosis subterapi, sehingga kemunculan resiko tripanotoleran dapat dihindari.

Bila ditinjau perolehan dosis tripanosidal hasil laporan beberapa peneliti (Tabel 6.1), menunjukkan temuan dosis 5,22 mg masih dalam rentang penggunaan empirik (non dosis maksimalis).

Tabel 6.1 Dosis tunggal tripanosidal diminazen aseturat

Dosis (mg/kg bb)	Tripanosoma (strain/isolat)	Hewan coba	Kepustakaan
3,5-16	<i>T. equiperdum</i>	Kuda	Peregrine, Mamman, 1993
3,5-7	<i>T. congolense</i> dan <i>T. vivax</i>	Domba	Mdachi <i>et al.</i> , 1995
14-25	<i>T. congolense</i> isolat 3274	Tikus	Mamman <i>et al.</i> , 1995 ^a
7	<i>T. congolense</i> isolat IL3274	Kambing	Mamman <i>et al.</i> , 1995 ^b
s/d 10 mg	Semua strain	Sapi	Hoechst 1999
3,5-28	<i>T. congolense</i> isolat MBOI/et/97/Pawe 7 dan MBOI/et/97/Pawe 87	Tikus	Afewerk <i>et al.</i> , (2000)
4,02	<i>T. evansi</i> isolat India	Kambing	Paramjit <i>et al.</i> , (2002)

6.2.2 Penentuan batas kadar terapi

Hasil perhitungan batas kadar terapi (Lampiran 24), memiliki makna merupakan harga batas minimum efektif. Penetapan tersebut didasarkan pertimbangan temuan dosis 5,22 mg/kg berat badan adalah dosis efektif minimum pencapaian respon tripanosidal 100 %. Asumsi tersebut secara hipotetik berdampak kenaikan dosis di atas 5,22 mg/kg berat badan akan didapatkan kadar batas terapi di atas kadar minimum tripanosidal 13,29 µg/ml.

Kadar batas terapi 13,29 µg/ml hasil temuan hipotetik pada dasarnya memiliki nilai > kadar minimum tripanosidal secara *in vitro*. Sifat temuan kadar batas terapi di atas kadar minimum tripanosidal *in vitro* amat diperlukan mengingat harga 13,29 µg/ml akan

berkurang 4,9 % menjadi 12,64 $\mu\text{g/ml}$ manakala diberikan intramuskular ($F_a = 95,1 \%$). Perolehan harga 12,64 $\mu\text{g/ml}$ diyakini masih bersifat tripanosidal kuat bila dibanding perolehan batas harga tripanosidal hasil studi *in vitro* ($< 9,54 \mu\text{g/ml}$).

Kadar batas terapi kerabat *Tripanosoma* memiliki harga variasi, sebagai ilustrasi adalah laporan Mamman *et al.*, (1996) dengan ketetapan kadar 13,02 $\mu\text{g/ml}$ terhadap *T. congolense* isolat IL 3338. Ilustrasi tambahan adalah perkiraan dari Paramjit *et al.*, (2002) dengan ketetapan kadar $> 0,5 \mu\text{g/ml}$ terhadap *T. evansi* isolat India.

Variasi kadar batas terapi menunjukkan terdapat keterkaitan kuat antara jenis parasit dengan jenis hewan coba yang digunakan sebagai medium obat. Jenis parasit kerabat *Tripanosoma* hasil dari isolasi hewan tripanotoleran, akan menghasilkan kadar batas terapi relatif tinggi. Sedang jenis parasit kerabat *Tripanosoma* berasal dari individu sensitif terhadap parasit, akan memperoleh batas kadar terapi kecil.

Fenomena variasi perolehan batas kadar terapi dipengaruhi pula oleh kepekaan parasit terhadap kemoterapi antitripanosoma yang diberikan. Pernyataan tersebut didasarkan pada perolehan harga kadar tripanosidal dalam studi *in vitro* (Tabel 5.3) antara diminazen aseturat dengan suramin. Suramin sebagai kemoterapi antitripanosoma andalan mampu bersifat tripanosidal hampir 2,89

kali lebih kecil dibanding diminazen aseturat (suramin 3,3 ug/ml, diminazen aseturat 9,54 ug/ml).

De Souza (2002) melukiskan fenomena variasi antara parasit dengan kemoterapi antitripanosoma akibat adanya peranan aktivitas AVS kerabat Tripanosoma. Pendapat tersebut sebelumnya juga dinyatakan oleh Seed (2001), dengan perkiraan peranan AVS bahkan mampu mendorong terjadi upaya pembentukan perlindungan parasit dari ancaman kemoterapi antitripanosoma. Pernyataan Seed (2001) dan De Souza (2002) bila dikaitkan pemikiran Artama *et al.*, (1992), maka dapat disimpulkan pengubah-ubahan protein permukaan dapat dilakukan 10^7 kopi dalam waktu singkat.

Perilaku kemampuan mengubah-ubah protein permukaan pada kerabat Tripanosoma, sangat menyulitkan bagi klinisi dalam upaya pemberian obat. Sebab akan terjadi resiko resistensi seandainya batas kadar terapi bersifat subterapeutik (tidak berkemampuan tripanosidal). Dalam pengalaman empirik di lapangan perkiraan penentuan batas kadar terapi sebaiknya sedikit di atas temuan studi laboratorik. Dalam memperkirakan batas kadar terapi tersebut tetap mengikuti prinsip kehati-hatian terutama bila akan diekstrapolasikan terhadap individu patofisiologi atau non-spesies spesifik.

6.2.3 Penentuan dosis muatan

Hasil perolehan dosis muatan sebesar dua kali dosis terapi (10,44 mg/kg berat badan) diyakini mampu menghasilkan respon farmakodinami tripanosidal. Perolehan dosis muatan tersebut bila dikaitkan dengan harga $F_a = 95,1\%$, maka jumlah obat yang masuk hanya 9,93 mg/kg berat badan. Ternyata jumlah 9,93 mg/kg berat badan bila dikaji catatan penggunaan dilapangan (Tabel 6.1), masih tergolong sering digunakan. Namun jumlah tersebut harus tetap diberikan secara hati-hati mengingat tak semua hewan mampu menanggapi secara faali.

Dalam aplikasi klinik penggunaan diminazen aseturat pada kelompok ruminansia, cukup beragam mulai pada dosis 5, 7, 10 hingga 14 mg/kg berat badan. Dalam aplikasi dilapangan pemberian 17,5 mg/kg berat badan intramuskular pada kerbau jantan, akan menimbulkan kematian 11/2 jam kemudian. Penggunaan hingga batas 14 mg/kg berat badan untuk sapi dilaporkan tak didapat gejala intoksikasi. Tetapi di atas 14 mg/kg berat badan mulai muncul gejala intoksikasi (gejala persyarafan). Pemberian secara intravena hanya terbatas hingga 7 mg/kg berat badan, pemberian di atas 7 mg/kg berat badan dapat memunculkan resiko keracunan (Finelle, 1957 dikutip oleh Fairclough, 1963).

Pada unta dosis maksimalis dianjurkan terbatas hingga 10 mg/kg berat badan, pemberian di atas dosis maksimalis hingga 40 mgn akan menampakkan gejala toksik (Homeida *et al.*, 1981).

Uraian laporan Finelle (1957), dikutip Fairclough (1963), bila dikaitkan laporan Homeida *et al.*, (1981), maka perolehan dosis muatan 10,44 mg/kg berat badan termasuk mendekati dosis maksimal. Peringatan tersebut menjadikan peningkatan kewaspadaan pengguna, kendati masih dalam rentang toleransi. Rentang toleransi dimaksudkan diperkirakan pemberian hingga 10 mg/kg berat badan pada sapi, masih ditoleransi (Hoechst, 1999).

6.2.4 Penentuan dosis penjagaan

Perolehan dosis penjagaan sebesar 7 mg/kg berat badan menyiratkan jumlah tersebut sama dengan dua kali dosis lazim (3,5 mg) sebelum ditemukan dosis terapi (5,22 mg/kg berat badan).

Pengkajian penggunaan dosis ulangan oleh beberapa peneliti, menunjukkan penetapan dosis penjagaan sebesar 7 mg/kg berat badan masih dalam kriteria rentang penggunaan dosis berulang (Tabel 6.2).

Harapan pemberian ulangan dari beberapa peneliti adalah agar *Tripanosoma* dalam tubuh terinfeksi mendapat ancaman ulangan. Secara hipotetik pengertian pemberian ancaman ulangan mengandung makna terdapat bagian jeda ancaman sebelum dosis ulangan diberikan. Keberadaan jeda ancaman tersebut membuka kesempatan *Tripanosoma* mengembangkan aktivitas AVS dengan dampak lanjutan dosis ulangan akan mudah dikenali oleh protein permukaan. Bila protein permukaan *Tripanosoma* mampu

melindungi ancaman ulangan diminazen aseturat maka akan terbentuk strain baru parasit kebal diminazen aseturat. Keadaan tersebut bila dikaitkan laporan Van den Bossche (2000), mengenai ditemukan parasit kebal, maka dapat disimpulkan jeda merupakan faktor pemicu timbulnya parasit kebal.

Tabel 6.2 Aneka dosis ulangan diminazen aseturat dalam klinik

Dosis ulangan (mg/kg bb) i.m	Tripanosoma (strain/isolat)	Ternak	Kepustakaan
s/d 14	Tak disebutkan	Sapi	Fairclough, 1963.
5	Tak disebutkan	Sapi	Peregrine, Mamman, 1993
7	<i>T. congolense</i> , <i>T. vivax</i>	Domba	Mdachi et al., 1995
1	Tak disebutkan	Kerbau, Sapi	Van den Bossche, 2000
3,12	<i>T. evansi</i> isolat India	Kambing	Paramjit et al., 2002

Dalam menetapkan dosis penjangaan pertimbangan pertama yang digunakan adalah perkiraan perolehan kadar tripanosidal adekuat. Pertimbangan lain adalah dapat dilakukan pengaturan agar setiap pemberian ulangan dosis penjangaan tetap menghasilkan kadar tripanosidal berkesinambungan serta tak menimbulkan toksik.

Penetapan dosis 7 mg/kg berat badan secara teoritik dimungkinkan memenuhi pertimbangan penetapan dosis penjangaan, serta tetap di atas dosis terapi bila terjadi fenomena *first pass effect*. Sedangkan penetapan dosis penjangaan sejumlah 7 mg/kg berat badan tidak melebihi dosis maksimalis 14 mg/kg berat badan, dengan demikian akan memudahkan dalam pengaturan ulang.

6.2.5 Penentuan interval waktu pemberian

Hasil penetapan interval waktu pemberian sebesar 31 menit, menunjukkan $<$ waktu paruh eliminasi baik kelompok penderita tertular ($94,91 \pm 33,2$) maupun penderita sehat ($72,05 \pm 14,3$). Menurut Ritschel (1992), bila laju absorpsi (K_a) amat cepat sementara interval waktu pemberian $<$ waktu paruh eliminasi, maka pemberian ulangan akan menghasilkan penumpukan kadar. Penumpukan kadar akan bersifat akumulasi sehingga kadar hasil pemberian pertama akan mengalami pertambahan sesuai jumlah ulangan yang diberikan. Strategi penumpukan kadar tersebut dikenal dengan cara superposisi dengan implikasi akan diperoleh sejumlah kadar dengan peningkatan perlahan sesuai ulangan yang diberikan (Shargel, Yu, 1999).

Pencapaian kadar tinggi secara penumpukan menggunakan konsep analogi superposisi, amat menguntungkan mengingat tubuh dipacu menerima sejumlah obat secara bertingkat. Penerimaan sejumlah obat selanjutnya dilakukan pelepasan ikatan oleh makromolekul secara perlahan sehingga obat bebas berada di seluruh tubuh dan siap melakukan aktivitas farmakodinami.

Strategi konsep analogi superposisi memiliki kelemahan yang harus diwaspadai yaitu dapat menimbulkan akumulasi sehingga terbentuk kadar berlebihan dengan dampak lanjutan toksik. Namun penumpukan kadar toksik dalam perhitungan hipotetik dapat

diperkirakan sebelumnya. Sehingga seandainya dalam ulangan ke n_i diketahui timbul gejala toksik dapat segera dihentikan.

6.2.6 Penentuan jumlah pemberian ulangan

Hasil penetapan jumlah ulangan sebesar empat kali menunjukkan adanya upaya untuk mempertinggi perolehan kadar terapi serta mempertahankan kadar terapi hingga waktu tertentu.

Strategi pengobatan melalui pemberian ulangan memiliki tujuan yaitu mendorong invasi obat secara berkesinambungan hingga selang waktu tertentu. Jenis pengobatan menggunakan strategi pemberian berulang hingga waktu tertentu, umumnya dilakukan untuk kasus klinik infeksi sistemik diakibatkan jamur, bakteri atau parasit. Pada kasus klinik non-infeksi jenis pengobatan tersebut banyak diaplikasikan untuk tujuan terapi simptomatik. Pada aplikasi klinik menunjukkan banyaknya ulangan yang diberikan terkait langsung dengan lamanya masa terapi yang dilakukan.

Perolehan kadar penjagaan pada setiap subyek hewan tidak dapat diramalkan dan terkait erat dengan ekspresi enzim metabolisme yang dimiliki secara faali oleh hewan tersebut (Pope dan Baggot, 1983). Contoh dalam penggunaannya adalah beberapa obat seperti fenilbutazon pada anjing dan kuda, asetosal pada kucing, sulfadiazin pada anjing. Pemberian ulangan contoh obat tersebut tidak akan menimbulkan perolehan kadar terapi lama, namun justru menimbulkan intoksikasi akibat akumulasi berlebihan.

Keadaan demikian juga ditemukan pada diminazen aseturat pemberian pada anjing dan unta (Homeida *et al.*, 1981).

Tinjauan pemberian ulangan dalam waktu lama terkait kemampuan ikatan obat - makromolekul, diketahui pada beberapa obat dengan afinitas ikatan tinggi, akan menghasilkan ketersediaanhayati lama. Faktor lain penyebab ketersediaanhayati suatu obat lama adalah ketidaksempurnaan aktivitas metabolisme dalam memecah obat menjadi lebih polar. Keadaan itu mengakibatkan perolehan tetapan β bernilai kecil. Harga β yang kecil akan beresiko memunculkan bahaya residu bidang kesehatan terutama bila daging akan dikonsumsi. Bila pemotongan ternak dilakukan saat tujuh hingga sepuluh kali $T_{1/2\beta}$, maka jaminan cemaran residu obat hewan pada produk daging cukup minimal. Namun bila pemotongan dilakukan pada waktu lebih kecil dari $T_{1/2\beta}$, maka akan ditemui residu obat hewan. Contoh konkrit problema di atas sering ditemui pada sapi penderita tripanosomiasis pasca pengobatan suramin. Lazuardi dan Soepartono (1999), menguraikan pemotongan sapi kurang dari 12 hari pasca terapi, dengan mudah akan ditemui residu obat pada daging, hal itu disebabkan $T_{1/2\beta}$ suramin pada sapi rerata $288.75 \pm 100,2 \text{ jam}^{-1}$.

6.3 Uji Klinik

6.3.1 Uji tripanosidal

Tinjauan hasil pengerjaan menunjukkan parasitemia kambing perlakuan (Cyde-1 - Cyde-7) ditemui pada hari ke lima dengan dosis penularan rerata $40,43.10^7$ Trip/ml (Tabel 5.17, Tabel 5.18). Dari waktu ke waktu keadaan tersebut makin berkembang dan hari ke tujuh (dosis penularan rerata $41,14.10^7$ Trip/ml) seluruh kambing menderita parasitemia ++. Dalam perkembangan tersebut dampak gangguan pada sistem haemopoetik belum begitu nyata. Sebagai indikator adalah harga Hb kambing hingga hari ke tujuh masih dalam kriteria normal.

Perkembangan parasitemia kelompok kontrol (K-1 s/d K-7) dimulai hari ke enam (rerata $44,29.10^7$ Trip/ml) dan seperti kelompok perlakuan, hari ke tujuh seluruh kambing berkondisi parasitemia ++.

Perkembangan parasitemia antara kelompok perlakuan dengan kelompok kontrol, terlihat cukup seragam sehingga tepat hari ke tujuh seluruh kambing berkondisi parasitemia ++. Temuan tersebut dapat diimengerti mengingat parasit maupun jumlah dosis penularan cukup seragam. Bila jenis parasit berbeda-beda atau jenis induk semang berbeda-beda maka temuan kondisi parasitemia pada hari ke tujuh belum tentu terjadi. Keadaan tersebut terkait erat dengan fenomena AVS yang dimiliki oleh kerabat *Tripanosoma*. Perilaku AVS hingga kini diyakini

dikendalikan dalam bagian mitokondria parasit yang disebut kinetoplastid asam dioksinibo nukleat (K-DNA) terutama unsur minisirkel dan maksisirkel asam inti.

Tinjauan keberhasilan aplikasi formula pemberian berulang (Tabel 5.16), menunjukkan daya tripanosidal ditemui ≥ 24 jam pasca pengobatan (Tabel 5.19) pada tingkat kepercayaan $< 0,05$ (Lampiran 27-29). Paparan diminazen aseturat 5 jam pasca pengobatan masih ditemui adanya parasit *Tripanosoma* (Cyde-1, Cyde-5, Cyde-6, Cyde-7). Namun demikian sudah terdapat beberapa kambing dari kelompok perlakuan berhasil diobati (Cyde-2, Cyde-3, Cyde-4). Temuan hasil penelitian menunjukkan 5 jam pasca paparan diminazen aseturat pemberian berulang, peluang keberhasilan pengobatan masih mencapai 42,9 %. Bila temuan tersebut bersifat linier maka perkiraan 10 jam pasca paparan diminazen aseturat pemberian berulang peluang keberhasilan dua kali 42,9 % (85,7 %). Pencapaian keberhasilan pengobatan (100% tereliminasi) diperkirakan terjadi pada paparan 11,65 jam diminazen aseturat pemberian berulang. Dengan demikian rerata keberhasilan pengobatan tiap % harus terpaparkan diminazen aseturat pemberian berulang ± 7 menit (0,116 jam). Keberhasilan pengobatan dimaksudkan adalah pada kumulatif penularan selama 7 hari rerata = $33,41 \cdot 10^8$ Trip/ml (setiap hari mendapatkan rerata $46,57 \cdot 10^7$ Trip/ml hingga $57 \cdot 10^7$ Trip/ml).

Tinjauan perolehan hasil uji tripanosidal dikaitkan hasil laporan Lazuardi (1994) menggunakan cara uji dan jenis parasit sama namun obat dan dosis berbeda, menunjukkan adanya variasi perbedaan hasil. Laporan Lazuardi (1994) menggunakan tikus tertular dengan suramin sebagai antitripanosoma menyatakan perlu dibutuhkan paling sedikit 36-48 jam paparan obat untuk dapat membunuh hingga 100 %. Hasil laporan Lazuardi (1994) bila dibandingkan perolehan hasil uji tripanosidal, menunjukkan formula Tabel 5.16 lebih cepat membunuh.

Pengalaman empirik menunjukkan daya tripanosidal tergantung beberapa faktor yang menyertainya seperti waktu paparan *in vivo*, jumlah dan kemurnian parasit. Bacchi *et al.*, (1998) menguraikan faktor yang dimaksud pada tikus 1 hari pasca inokulasi *T. b. rhodensiense*, *T. b. brucei* kebal diamidin aromatik ($2,5 \cdot 10^5$ Trip), dibutuhkan ± 24 jam pemberian diminazen aseturat 25 mg/kg berat badan. Uraian tersebut secara tersirat memberikan pesan selagi parasit masih belum mengenal beberapa antitripanosoma dan masih dalam jumlah awal infeksi, maka pemberian ancaman harus mematikan. Bila ancaman obat satu kali tak tercapai maka beresiko mengenal kemoterapi antitripanosoma dan memperbanyak diri sehingga memunculkan kerabat parasit kebal obat.

Hasil pemeriksaan ulas darah keperluan pemantauan parasit (seri Gambar 5.11 dan seri Gambar 5.12), menunjukkan temuan parasit dalam tubuh kambing tidak semudah seperti pada tikus.

Keadaan tersebut menunjukkan diperlukan jumlah parasit cukup besar untuk memunculkan keadaan parasitemia pada kambing.

6.3.2 Uji biologis

Uji biologis merupakan salahsatu cara diagnosis dengan tingkat keyakinan tinggi. Dalam aplikasi lapangan teknik uji biologis menghasilkan spesifitas tinggi sehingga secara langsung dapat diketahui keberadaan parasit. Enyaru *et al.*, (1998) menggambarkan spesifitas uji biologis setara dengan uji serologis reaksi rantai polimerase, sehingga uji biologis didudukkan sebagai uji penentu.

Tinjauan perolehan hasil uji biologis menunjukkan secara meyakinkan formula pemberian regimen dosis berulang (Tabel 5.16), mampu mengeliminasi parasit ($p < 0,05$, Lampiran 28). Dalam pemeriksaan tersebut dlakukan hingga 45 hari, sehingga diyakini tak terjadi kemunculan ulang *Tripanosoma* pada kambing pasca pengobatan. Seandainya kemunculan ulang terjadi pasca pengobatan maka isolat parasit akan berubah dari isolat lapangan menjadi isolat laboratorium kebal *diminazen* aseturat pemberian berulang. Pada keadaan demikian tetap bersifat patogenik terhadap tikus namun waktu kematian pada tikus penderita parasitemia ++++ lebih dari 3-4 hari. Bacchi *et al.*, (1998) melukiskan penularan dengan *Tripanosoma* kebal *antitripanosoma*, mampu menimbulkan kematian pada tikus hingga 21 hari. Laporan tersebut menunjukkan

kendati terjadi perkembangbiakan isolat kebal antitripanosomiasis, dalam tubuh tikus suatu saat tikus akan mengalami kematian.

Merujuk laporan Partoutomo (1996) tentang tak terdapat pengaruh antara kualitas makanan terhadap kemunculan parasitemia, maka keberadaan parasit akan dapat terpantau melalui uji biologis pada kambing gizi rendah. Dengan demikian hasil uji biologis merupakan manifestasi menyeluruh mengenai keberadaan parasit pada kambing pasca pengobatan.

Rentang waktu pemeriksaan biologis dikaitkan dengan rentang waktu pengamatan uji tripanosidal, menunjukkan kesamaan yaitu \pm 45 hari. Rentang waktu tersebut pada dasarnya lebih lama bila dibandingkan dengan uji biologis hasil laporan Lazuardi (1994) dan hanya berlangsung 14 hari. Namun bila dikaitkan dengan rekomendasi BALITVET, Bogor, maka masa pemeriksaan keberadaan parasit minimum hingga 45 hari, dapat terpenuhi.

Penggunaan tikus sebagai media uji di rasa sangat tepat mengingat mampu memenuhi kebutuhan karbohidrat, asam amino, asam lemak atau α -ketoglutarat untuk aktivitas glikolisis. Dalam aktivitas glikolisis parasit banyak bergantung hasil siklus asam trikarbositik serta peranan sitokrom. Sitokrom dimaksudkan adalah jenis sitokrom tergantung transport rantai elektron. Transport elektron amat dibutuhkan oleh Mitokondria dalam melakukan bioenergetik. Bila transport elektron terganggu maka respirasi

dalam mitokondria tak akan terbentuk dan pada gilirannya akan menyebabkan kematian parasit.

Dalam kehidupan di aliran darah, parasit *Tripanosoma* tak memiliki cadangan energi dalam bentuk glikogen atau kompleks karbohidrat lain termasuk energi tinggi hasil fosforilasi. Bila pasokan glukose tak didapat maka perolehan energi dari Adenosin Trifosfat akan cepat menurun. Pada keadaan demikian parasit *Tripanosoma* berusaha mempertahankan hidupnya dengan mencari sumber alternatif glukose dalam jumlah besar. Bila sumber alternatif glukose sukar didapatkan dari tubuh penderita, maka lambat laun *Tripanosoma* akan mati.

Bila pasokan glukose mudah didapat maka aktivitas glikolisis dapat terjadi dalam glikosom (Gambar 2.5). Selanjutnya glukose akan mengalami katabolisis dalam suasana aerob untuk menghasilkan beberapa unsur, sebagian besar diantaranya dan sekaligus hasil akhir adalah piruvat. Hasil akhir ikutan lain dengan jumlah kecil adalah asetat, suksinat dan CO₂. Namun demikian ada hal berbeda dalam aktivitas metabolisme parasit *Tripanosoma* dibanding umumnya sel eukaryot yaitu tak banyak memiliki laktat dehidrogenase dan piruvat dekarboksilase. Ketiadaan laktat dehidrogenase digantikan oleh reoksidasi NADH yang dibuat melalui glikolisis dengan bantuan dihidro aseton fosfat dan gliserol 3 fosfat (G-3-P). Kegiatan tersebut secara langsung mendorong kegiatan oksidase gliserol-3-fosfat ke mitokondria yang ada di

daerah sitosol dan digunakan untuk aktivitas bioenergetik di mitokondria.

6.3.3 Uji toksisitas

Pengamatan gejala klinik

Dampak pemberian berulang diminazen aseturat tampak dimunculkan dengan manifestasi gejala tremor (tingkat subakut), dan *anorexia nervosa* (tingkat akut). Gejala tingkat klinik toksisitas tingkat subakut selain tremor, tampak tak ditemui.

Fakta laboratorik menunjukkan bahwa kambing P1 dengan berat badan 26 kg ternyata memunculkan ekspresi gejala klinik tremor setelah diberikan formula pemberian ulang diminazen aseturat. Kambing P2 hingga P5 dengan berat badan rerata 25,75 kg, lebih tahan menerima formula pemberian ulangan. Namun ketahanan kambing P2 hingga P5 dalam menerima formula pemberian berulang terbatas sehingga P4 dan P5 timbul *anorexia nervosa*.

Ketahanan kambing perlakuan P2 dan P3 dalam menerima formula pemberian diminazen aseturat cukup tinggi sehingga mampu melakukan keseimbangan kendati tetap mengalami kebengkakan di daerah penyuntikan.

Kambing P4 (25 kg) cukup menarik untuk dikaji mengingat memunculkan gejala akut *anorexia nervosa* sambil mengeluarkan *gland penis*. Kambing P4 dengan ekspresi gejala klinik ganda tampak memiliki ketahanan rendah. Fenomena tersebut terkait

erat dengan variabilitas genetik setiap individu. Sebagai analogi adalah uraian Thomson *et al.* (1991) tentang peranan serum kolinesterase sebagai enzim hidrolisis kolin ester (asetilkolin). Dalam fungsi faali enzim ini bekerja sebagai penyebab relaksasi otot melalui pemecahan suksinil kolin yang menumpuk di ujung saraf motorik. Bila uraian tersebut dikaitkan dengan temuan kambing P4, maka tidak menutup kemungkinan dapat terjadi pada kambing P4.

Kemunculan gejala klinik toksisitas umum yaitu kebengkakan di daerah penyuntikan, merupakan hal wajar pada sediaan komersial diminazen aseturat (Aliu, Ødegaard, 1985). Oleh sebab itu dipasaran sering dikemas dengan kombinasi antipirin (dipiron) untuk mengurangi rasa sakit di daerah penyuntikan (Hoechst, 1999).

Tinjauan hasil pengamatan gejala klinik bila dikaitkan laporan Finelle, 1957 (dikutip Fairclough, 1963) tentang batas dosis terapi pada sapi, menunjukkan pemberian 10,44 mg/kg berat badan cukup dekat dengan batas maksimal (14 mg/kg berat badan). Penambahan ulangan 7 mg/kg berat badan, secara hipotetik akan mendekati daerah maksimalis terutama bila dikaitkan dengan laporan Homeida *et al.* (1981) yaitu 10 mg/kg berat badan pada unta. Namun merujuk laporan Mamman *et al.*, (1995^b) pada kambing menggunakan dosis pengulangan 7 mg/kg berat badan hingga dua kali (intravena dan intramuskular) pada kambing, menunjukkan dosis 7 mg/kg berat badan masih dapat ditoleransi.

Perolehan jumlah diminazen aseturat di atas 3,5 mg/kg berat badan kemungkinan merupakan faktor penyebab keterbatasan kambing dalam menanggapi dinamika obat. Faktor tambahan lain adalah kemungkinan adanya penurunan kualitas produk aktivitas sistem haemopoetik tubuh akibat parasitemia. Pada keadaan demikian menyebabkan tubuh tidak mampu menanggapi dinamika obat secara sempurna. Seandainya interval waktu pemberian dibuat sangat jauh dari 31 menit (Mamman *et al.*, 1995^b menggunakan $\tau = 9$ hari dan 21 hari) maka tubuh akan lebih dapat bertoleransi. Namun tindakan tersebut mengandung resiko yaitu memunculkan waktu jeda perolehan kadar di bawah batas kadar terapi. Pada keadaan demikian akan memberikan kesempatan *Tripanosoma* untuk mengembangkan kemampuan AVS.

Jalan keluar untuk mengurangi akumulasi kadar pada formula pemberian berulang, dapat dilakukan dengan memberikan bantuan elektrolit dari luar. Upaya tersebut dimaksudkan untuk mendorong peningkatan intake protein dengan implikasi mendorong perbaikan kualitas makromolekul.

Merujuk hasil rerata tetapan $T_{1/2\beta}$ K6-K10 ($\pm 95 \text{ jam}^{-1}$) terkait penurunan anorexia, menunjukkan adanya hubungan kuat antara jumlah obat dengan aktivitas equilibrasi tubuh melalui metabolisme. Bila obat termetabolisme 48 jam pasca pemberian, maka akumulasi obat dalam tubuh makin berkurang mendekati separuh jumlah obat pada waktu 95 jam pasca pengobatan. Dengan demikian sekitar 4

hari pasca pengobatan jumlah akumulasi obat dalam tubuh akan menjadi separuh ($95 \text{ jam} / 24 \text{ jam} = 3,95$ dibulatkan 4 hari).

Fenomena kecepatan pemulihan gejala toksisitas setiap kambing, menunjukkan pada prinsipnya formula pemberian berulang dapat ditoleransi tubuh kambing. Pernyataan tersebut didasarkan temuan bahwa tak ditemukan kematian kambing selama perlakuan dilakukan. Tinjauan laporan Homeida *et al.*, (1981) mengenai ketidaktahanan diminazen aseturat akan ditampakkan dengan bentuk kematian 4 jam pasca pemberian 40 mg/kg berat badan.

Tinjauan hasil uji hipotesis menunjukkan terdapat kesamaan bermakna antara kelompok perlakuan dengan kelompok kontrol dalam menanggapi formula pemberian berulang ($p > 0,05$, Tabel 5.21, Lampiran 29). Dengan demikian kambing PE memiliki ketahanan bila diberikan formula diminazen aseturat pemberian berulang.

6.3.4 Pemeriksaan organ hati dan ginjal

Pemeriksaan makroskopis

Hasil pemeriksaan makroskopis menunjukkan ke dua organ kelompok perlakuan dibandingkan kontrol, tampak tak didapati perubahan bentuk, ukuran dan warna (termasuk penampakan nodul). Dengan demikian secara faali formula pemberian berulang diminazen aseturat secara fenotip tak mengakibatkan perubahan

bentuk ukuran maupun warna ke dua organ ($P > 0,05$, Tabel 5.22, Lampiran 30.1 Lampiran 30.5).

Studi toksisitas akut kemoterapi isometamidium pada babi *post mortem* pemberian dosis tinggi (35 mg/kg berat badan, intramuskular), menunjukkan terjadi keadaan kongesti pada hati. Sedangkan pada organ ginjal, tak ditemukan kelainan (Kinabo *et al.*, 1991). Namun menurut Philips *et al.*, (1967) mengenai pengamatan patognomonik hati tikus *post mortem*. Pada pemberian isometamidium klorida tingkat toksik, berupa pengecilan organ hati, dan pada ginjal tidak terjadi. Menganalisis hasil laporan Kinabo *et al.*, (1991) dan Philips *et al.*, (1967), menyiratkan organ ginjal kurang mengespresikan secara cepat bila terjadi kerusakan dibanding hati. Merujuk dari *Merck Veterinary Manual*, 2003. mengenai gambaran akut intoksikasi rodentisida dengan ditemuinya degenerasi melemak hati, menunjukkan pengamatan makros kerusakan hati lebih dahulu dapat diamati dibanding ginjal.

Kerusakan ginjal dapat ditemui seiring atau lebih nyata dibanding hati bila disebabkan penularan mikroorganisme atau dalam kasus reaksi *imunologic tissue injury*. Sudarto *et al.*, (1990), mencontohkan bahwa *T. evansi* mampu berpredileksi pada glomerulus ginjal tikus dan sel hati tikus. Seandainya dalam penelitian ini ditemui *T. evansi* isolat Bangkalan bermigrasi ke ginjal dan hati, maka ekspresi kebengkokan ke dua organ berlangsung simultan.

Dalam studi dampak formula diminazen aseturat pemberian berulang pada kambing (P1-P5), tubuh secara faali masih beraktivitas secara optimal. Dengan demikian fungsi hati maupun ginjal tidak terpengaruh apapun sehingga fungsi metabolisme diminazen aseturat dapat dilakukan. Implikasi tersebut berdampak faali yaitu pengaruh akumulasi obat makin berkurang, sehingga 76 jam pasca pengobatan akumulasi obat dapat ditoleransi semua kambing.

Pemeriksaan histopatologi organ hati

Pada pemeriksaan histopatologi organ hati kelompok perlakuan (200x) menunjukkan pada dasarnya hasil pemeriksaan sangat terkait dengan hasil pemeriksaan makroskopis hati. Dalam pemeriksaan makroskopis hati pada kambing kelompok perlakuan, tidak ditemui bentukan atau perubahan dalam permukaan organ hati. Dengan demikian hasil pemeriksaan biopsi hati menampakkan keadaan normal seperti halnya kontrol sehat.

Seri Gambar 5.13 menunjukkan di daerah segi tiga Kiernan dengan susunan susunan radier teratur serta gambaran sel hati normal, memiliki makna organ hati berfungsi secara optimal. Optimalisasi aktivitas hati berimplikasi optimalisasi fungsi (sekresi empedu, hematologik, resevoir darah, metabolisme, detoksifikasi), pada keadaan demikian organ hati membutuhkan keseimbangan komponen pendukung kerja diantaranya elektrolit, protein, darah.

Bila mengaitkan dengan timbulnya gejala anorexia pasca pemberian berulang (P1-P5), maka dukungan unsur pendukung kerja hati kurang terpenuhi. Pada keadaan demikian tindakan pemberian unsur pendukung artifisial sangat membantu. Hal tersebut akan mempercepat kinerja fungsi hati sekaligus sebagai unsur pengisi sumber energi saat kambing mengalami *anorexia*. Bila kambing perlakuan hingga lebih dari hari ke empat tetap terjadi penurunan nafsu makan dan minum maka resiko kematian dapat terjadi. Namun bila secara alami nafsu makan kembali pulih, menunjukkan pada saat hari ke satu hingga hari ke empat kerja organ metabolisme amat keras dengan hasil cukup memuaskan. Makna memuaskan menunjukkan secara dominan tidak ditemui kerusakan sel hati (Tabel 5.23).

Struktur diminazen aseturat dikaitkan dengan kemampuan detoksifikasi organ hati, menunjukkan secara hipotetik diminazen aseturat dapat berkomplek dengan unsur A-T asam inti sel hati. Namun hal tersebut tak terjadi, mengingat kemampuan detoksifikasi enzim hati serta bukan termasuk unsur asam inti kaya A-T. Bila kemampuan detoksifikasi melemah maka berimplikasi terhadap aktivitas sel hati terutama sintesis internal dengan dampak seperti paparan Gambar 2.10 (Cotran *et al.*, 1999).

Tinjauan peranan hati dalam melakukan metabolisme kelompok diamidin aromatik (mengandung dua aromatik-azo grup), dirasakan kerja hati cukup berat. Hal itu didasarkan pertimbangan unsur

dalam sitosol sel hepar dan mikrosom hati, harus memecah dua aromatik-grup azo menjadi unsur lebih hidrosolubel (Jenner, Testa, 1976). Peranan tersebut tidak mudah digantikan oleh enzim konjugasi dari organ lain, kendati menurut Gibson dan Skett (1984) dalam jumlah terbatas dapat ditemukan pada jaringan tubuh otot, paru, ginjal, usus.

Struktur diminazen aseturat dikaitkan dengan pernyataan Gibson, Skett (1984) tentang enzim konjugasi sebagai pemecah struktur aromatik, diperkirakan aktivitas metabolisme melibatkan enzim N-glukoronide konjugasi. Menurut Pope, Baggot (1983), enzim kelompok glukoronidase pada temak herbifora bekerja cukup efisien, dan ditemukan di mikrosomal hati. Oleh sebab itu bila jumlah kemoterapi kelompok diamidin aromatik tidak berlebihan, maka aktivitas metabolisme tergolong tidak terlalu berat. Namun bila jumlah kemoterapi kelompok diamidin aromatik dalam jumlah tinggi, maka aktivitas metabolisme semakin tinggi.

Pada penderita dengan kondisi disfungsi hati, maka aktivitas metabolisme tak akan optimal sehingga bermanifestasi nilai Cl (ml/menit) rendah. Dampak lanjutan pada keadaan tersebut adalah ketersediaan hayati obat dalam tubuh cukup lama. Bila lamanya ketersediaan hayati berhubungan secara linier dengan batas kadar terapi, akan menguntungkan dalam upaya pemberantasan tripanosomiasis. Namun bila hubungan tersebut tidak linier maka, akan memunculkan jeda waktu sebagai upaya mempertahankan

batas kadar terapi. Keadaan tersebut akan membuka kesempatan bagi parasit untuk mengembangkan kemampuan AVS.

Pemeriksaan histopatologi organ ginjal

Hasil pemeriksaan histologi organ ginjal menunjukkan melalui aktivitas metabolisme, unsur diminazen aseturat terpecah menjadi unsur lebih larut air di bawah berat molekul 515,45.

Merujuk pernyataan Ressang (1984), maka metabolit obat 25 % akan terbawa oleh darah menuju ke saluran lebih dalam yaitu glomerulus. Bila menganalogikan faali organ hati pada manusiadengan kerja optimal, maka diperkirakan laju ekskresi setiap unit glomerulus 2 ml /detik (Ritschel,1992). Ekskresi metabolit melalui mekanisme filtrasi glomerulus pada temak ruminasia, akan menghasilkan metabolit bebas (tak terikat makromolekul).

Ditinjau sifat pH urine golongan temak herbifora, diketahui bahwa sifat alkalis (pH 7 hingga pH 8) akan lebih memudahkan metabolit non-ionik berdifusi pada unit glomerulus. Khusus di bagian tubulus proksimalis dibutuhkan suatu unsur mediasi karier dari dalam tubuh sehingga menjadikan metabolit lebih bersifat polar (Pope, Baggot, 1983). Dalam pengeluaran sisa metabolit diminazen aseturat melalui unit glomerulus, tak menampakan dominasi kerusakan tubulus kontortus ginjal. Pemeriksaan lebih lanjutan

menunjukkan tidak ditemukannya penyempitan ruang antara kapsula Bowman dengan kortek.

Pengamatan adanya pengkerutan glomerulus kelompok perlakuan (P1-P5), ternyata tidak ditemukan. Dengan demikian metabolit diminazen aseturat tidak bersifat sitotoksik kendati berjumlah tidak sedikit. Namun seandainya bersifat toksik maka sel endotel tubulus kontortus (proksimal atau distal) akan mengalami *chemical injuri*.

Bila menganalogikan pendapat Cotran *et al.*, (1999) maka implikasi rangsangan kimia akan berdampak iskemia lokal sehingga transport oksigen ke dalam sel terganggu (anoksia).

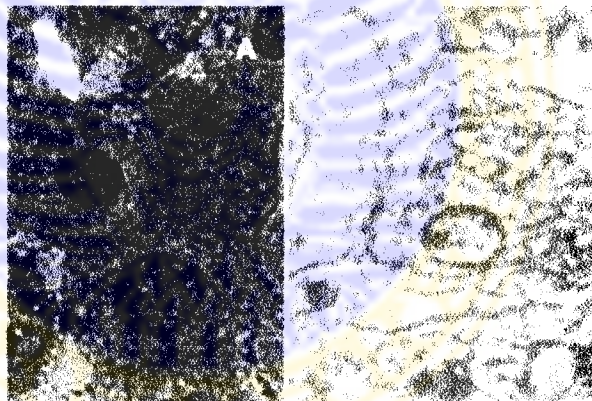
Dampak lanjutan adalah penurunan adenosin tri fosfat dengan implikasi kenaikan Ca^{2+} dalam sitosol serta mendorong aktivasi fosfolipase, protease. Rangkaian dampak tersebut adalah degradasi fosfolipid serta kerusakan unsur sitoskeletal, dan tanda awal kerusakan membran (ditemukan produk pecahan lemak).

Implikasi awal rangsangan kimia pada sel tubulus kontortus akan mengakibatkan reperfusi dengan dampak gangguan parensim sel (gangguan O_2 , H_2O_2 , OH^-). Keadaan tersebut akan merangsang peroksidasi lemak, dan merupakan proses awal kerusakan membran sehingga berlanjut menjadi piknosis, karyopiknosis, karyolisis.

Pengamatan seri Gambar 5.14 menunjukkan perwakilan salahsatu kambing perlakuan dalam satu lapang pandang, tak

ditemui keadaan degenerasi sel. Keadaan tersebut dapat dibedakan dengan kondisi ginjal pada kelompok kontrol sehat dan sakit. Dengan demikian pemberian formula diminazen aseturat pemberian berulang secara signifikan tak mengakibatkan kerusakan struktur mikroskopis organ ginjal (Gambar 6.5^{A,B}).

Gambar 6.5^A. menunjukkan struktur sel hati bagian inti tak mengalami desakan apapun demikian pula bagian sitoplasma. Bagian sitoplasma tak terdapat vacoula lemak. Dinding inti sel masih jemih, demikian pula dinding sel hati (*lipid bilayer*) serta dinding sel hati masih tak terjadi pengkerutan kedalam.



Gambar 6.5. Struktur sel hati ^(A) dan sel epitel tubulus proksimalis ginjal ^(B) kambing pasca pengobatan pemberian berulang (1000x).

Gambar 6.5^B menunjukkan struktur sel tubular ginjal yang tak disertai adanya sel radang (PMN) dengan masa sitoplasma tak mengalami pengkerutan, dinding inti jemih dan struktur internal tetap jemih.

Hasil uji hipotesis tentang keamanan penggunaan dengan kemungkinan dampak kerusakan organ hati, ginjal hasil pemberian berulang diminazen aseturat menunjukkan fakta, secara klinik aplikasi pada kambing cukup aman ($P < 0,05$, Tabel 5.24, Lampiran 31).

6.3.5 Studi perolehan waktu penjagaan kadar terapi

Pemeriksaan sebagian kimia klinik fungsi hati dan ginjal menunjukkan makna, secara faali ke dua organ akan menanggapi keberadaan diminazen aseturat sesuai kemampuan. Makna tersebut secara eksperimental dapat digunakan sebagai salahsatu upaya mengurangi variabilitas dalam tubuh kambing.

Tinjauan perolehan hasil kemampuan menjaga batas kadar terapi ($13,29 \mu\text{g/ml}$) lebih dari 24 jam dapat terpenuhi pada seluruh kambing. Keadaan tersebut menunjukkan perancangan yang dilakukan sesuai harapan. Dalam rajah grafik semi log (Gambar 5.15 dan Gambar 5.16) bila dilakukan penarikan garis aksis pada $13,29 \mu\text{g/ml}$ maka akan terpenuhi rerata waktu lebih dari 24 jam ($P > 0,05$, Tabel 5.26, Lampiran 42). Perancangan tersebut berhasil dirumuskan mengingat seluruh perwatakan kinetika ADME setiap individu mengikuti pola linier kompartemental dimana $k_a > \alpha > \beta$ (Wagner, 1975). Seandainya pada kondisi klinik tetapan laju antar kompartemen bergantung dosis (non-linier), maka akan sulit diperoleh kadar tinggi dengan cara penumpukan.

Dalam aplikasi klinik antimikroba pada hewan, Martinez (1998) mengingatkan pentingnya pertimbangan aturan *postantibiotic drug effects* (PAE) dalam pengaturan regimen dosis. Pertimbangan PAE banyak diperuntukkan terhadap senyawa aminoglikosida, penisilin derivat serta kelompok antibiotik di luar ke duanya. Aturan PAE dimaksudkan adalah seperti kutipan di bawah ini.

Postantibiotics drug effects (PAE) as a rule :

The duration of PAE increases with dose and duration of exposure, up to some maximum effect (Martinez, 1998).

Tinjauan konsep PAE serta dikaitkan upaya perancangan regimen dosis, maka daya tripanosidal amat tergantung dengan penjagaan kadar lebih dari atau sama dengan batas kadar terapi, dan lamanya ancaman terhadap parasit. Mengingat hasil dalam perancangan regimen dosis berulang memenuhi kriteria PAE, maka penggunaan dalam klinik tetap mengikuti makna PAE dengan implikasi eliminasi parasit.

Perolehan kadar observasi setiap kambing (Lampiran 32-Lampiran 41) dikaitkan perkiraan kadar estimasi *superimpose* teoritik (Lampiran 24-Lampiran 26), secara umum menunjukkan terdapat beberapa kambing dengan harga mendekati kesamaan. Harga mendekati kesamaan dimaksudkan adalah perolehan kadar puncak observasi mendekati harga puncak estimasi hasil perhitungan hipotetik. Nilai kedekatan harga tersebut tak ditemui setiap waktu dan tak terjadi pada kambing.

Kadar puncak estimasi *superimpos* hasil perkiraan hipotetik di peroleh harga 79,428 ug/ml. Kedekatan hasil perolehan kadar puncak observasi ditampakan oleh kambing sakit-1 dengan harga 82,880 ug/ml. sedangkan kambing sehat-2 seharga 75,025 ug/ml.

Fenomena tersebut dapat terjadi akibat banyak faktor, diantaranya adalah parameter kinetik yang digunakan sebagai perhitungan hipotetik bukan berasal dari kambing sama. Faktor perkembangan individu berkaitan dengan dampak perkembangan parasit serta faktor varibilitas genetik dalam menanggapi obat.

Perolehan kadar puncak jauh di atas kadar estimasi juga ditampakan oleh beberapa kambing diantaranya sakit-2 88,53 ug/ml, sakit-3 87, 438 ug/ml dan sehat-4 89,872 ug/ml. Temuan tersebut sangat menarik mengingat di peroleh dari kelompok kambing sakit, dengan implikas mampu mengancam keberadaan parasit ningga ke wilayah persyarafan. Dalam studi perolehan kadar pada cairan serebrospinal kambing Mamman dan Peregrine (1994) menyatakan struktur aromatik diamidin (diminazen aseturat) mampu menembus *blood brain barrier* kendati kadar yang diperoleh lebih sedikit dibandingkan pada plasma Perolehan harga *means residance time* (MRT) antara ke dua kelompok kambing perlakuan (sakit-1 hingga sakit-5 dan sehat-1 hingga sehat-5), menunjukkan keberadaan obat tidak berbeda jauh (Lampiran 32-Lampiran 41).

Nilai rerata MRT kelompok sehat diperoleh $10,48 \pm 2,5$ hari sedangkan nilai rerata MRT kelompok sakit $10,68 \pm 4,19$ hari. Nilai

tersebut bila dibandingkan perolehan hasil penelitian Mamman dan Peregrine (1994), cukup berbeda. Perbedaan tersebut disebabkan perbedaan dosis dan formula pemberian.

Nilai MRT dalam kebutuhan aplikasi tripanosidal tidak terkait dengan kepentingan kadar terapi, namun dapat digunakan untuk memperkirakan waktu henti obat. Peranan MRT dalam memperkirakan waktu henti obat dapat dimanfaatkan untuk menentukan ulangan pemberian. Bila diketahui nilai MRT ke dua kelompok berkisar antara 10-11 hari, maka ulangan dapat diberikan 11-12 hari kemudian.

Terkait dengan upaya ulangan pemberian formula pengobatan bila masih dirasakan perlu dapat mengikuti tiga pilihan. Pilihan pertama adalah bila dikehendaki perolehan batas kadar terapi hanya sekitar Letal Dosis Median (LDM). Bila merujuk analisis pada Tabel 5.3 dengan cara penghitungan 50 % *end point* (50% EP) seperti perhitungan dalam Tabel 6.3, maka ulangan dilakukan sekitar 10 hari.

Tabel 6.3. Harga letal dosis median secara *in vitro*

Dim. Aseturat ($\mu\text{g/ml}$)	Log. dosis	Σ kematian dari 3 sumuran mikroplat	% Respon	Probit *
5,30	0,724	3	100,0	8,09
6,36	0,803	2	66,6	5,44
7,42	0,870	2	66,6	5,44
8,48	0,928	1	33,3	4,56

* Daftar nilai probit pada Lampiran 23

LDM hub. log dosis vs. probit ($Y=19,137+15,946X$) = 0,887, antilog = 7,702 $\mu\text{g/ml}$.

Dalam pemilihan model ke dua dilakukan bila hewan penderita masih relatif tahan terhadap pengaruh obat serta dirasakan perlu diberikan ulangan, dapat diberikan 9 hari kemudian. Pilihan ke dua dirancang dengan perkiraan kadar adalah 8,48 µg/ml. Pilihan ke tiga ulangan dilakukan antara 4-5 hari, dengan pertimbangan hewan cukup tahan (Tabel 6.4).

Tabel 6.4. Pilihan pemberian ulangan regimen dosis baru

Kode	7,702 µg/ml*	8,480 µg/ml**	13,290 µg/ml***
Sakit-1	8,540 hari	7,370 hari	4,260 hari
Sakit-2	10,330 hari	8,860 hari	2,200 hari
Sakit-3	6,780 hari	6,250 hari	3,910 hari
Sakit-4	14,000 hari	12,60 hari	5,010 hari
Sakit-5	12,570 hari	11,420 hari	5,710 hari
Sehat-1	8,740 hari	7,950 hari	4,410 hari
Sehat-2	7,360 hari	6,440 hari	2,300 hari
Sehat-3	8,200 hari	6,910 hari	1,750 hari
Sehat-4	14,220 hari	12,540 hari	5,030 hari
Sehat-5	11,170 hari	10,060 hari	5,020 hari
Rerata	10,190 ± 2,7 hari	9,040 ± 2,5 hari	3,960 ± 1,4 hari

*, ** Perhitungan Lampiran 44, *** Perhitungan Lampiran 32-Lampiran 41.

6.3.6 Pemeriksaan seroparasitologi

Hasil pemeriksaan seroparasitologi menunjukkan serum sampel asal kambing penderita tripanosomiasis pasca pengobatan diminazen aseturat, tak tampak temuan aglutinasi (Gambar 5.33). Makna tersebut dapat berarti (1) tidak terdapat senyawa kebal atau (2) terdapat namun sedikit sehingga tak mampu saling ikat.

Senyawa kebal awal infeksi IgM antitripanosoma akan beredar dalam tubuh sekitar 21 hari. Selang 2-3 hari selanjutnya disusul

beredarnya senyawa kebal IgG antitripanosoma hingga sekitar 40 hari (*The manual of tropical veterinary parasitology*, 1990). Menurut Koesdarto, (1998) komponen kebal IgG *T. evansi* penimbul wabah di Indonesia mencapai puncaknya sekitar 7 hari dan hari ke 10 telah terjadi penurunan signifikan. Terkait dengan uraian tersebut bila dihubungkan hasil pemeriksaan CATT, maka dapat disimpulkan serum sampel saat dilakukan pemeriksaan telah terjadi penurunan titer antibodi hingga tak terpantau. Kesimpulan tersebut bila dikaitkan dengan saat pengambilan serum sampel (48 hari pasca pengobatan), cukup berdasarkan mengingat hari ke 48 kandungan titer IgG dalam tubuh sangat berkurang. Pada keadaan demikian *common surface antigen* CATT tak mampu memantau keberadaan IgG. Seandainya dalam aplikasi uji tripanosidal terjadi kegagalan penggunaan, maka keberadaan parasit akan tetap berlangsung. Temuan itu akan memunculkan IgG akan berlangsung > 40 hari. Bila formula pemberian berulang gagal maka pada pemeriksaan serum akan terpantau keberadaan IgG. Tetapi bila sukses maka tidak ada komponen dalam tubuh (*Tripanosoma*) yang mampu memperlama keberadaan IgG ($p < 0,05$, Tabel 5.29, Lampiran 43).

BAB 7 KESIMPULAN DAN SARAN

7.1 Kesimpulan

1. Regimen dosis pemberian berulang diminazen aseturat seperti di bawah, bersifat tripanosidal terhadap *T. evansi* isolat Bangkalan.

REGIMEN DOSIS DIMINAZEN ASETURAT :

Pemberian awal dengan dosis muatan	:	10,44 mg/kg berat badan
Pemberian ulangan dengan dosis penjagaan	:	7 mg/kg berat badan
Interval pemberian	:	31 menit
Jumlah ulangan	:	4 kali
Rute pemberian	:	Intramuskular

2. Rancangan regimen dosis diminazen aseturat pemberian berulang tak menimbulkan dampak toksik pada kambing PE
3. Rancangan regimen dosis diminazen aseturat pemberian berulang mendapatkan waktu penjagaan kadar rerata 3,7 hingga 4,2 hari.

7.2 Saran

1. Dalam aplikasi klinik pada sapi, kerbau, kuda terinfeksi *T. evansi* isolat di Indonesia, dapat digunakan acuan teori untuk menghasilkan modifikasi regimen dosis sesuai di lapangan.
2. Bila regimen dosis hasil penelitian akan diterapkan di lapangan, maka perlu dilakukan penyuluhan kepada pemilik ternak mengenai pentingnya memenuhi seluruh rangkaian pengobatan.

DAFTAR PUSTAKA

- Afewerk Y, Clausen PH, Abebe G, Tilahun G, Mehlitz D, 2000. Multiple-drug Resistant *Trypanosoma congolense* Populations In Village Cattle of Metekel District, North-West Ethiopia. *Acta Tropica.*, 76 : 231-238.
- Aliu YO, 1989. In Vitro Techniques for Identifying and quantifying Drug Resistance In *Trypanosoma brucei brucei* : In (Peregrine AS, ed). *Chemotherapy for Trypanosoma (Proceeding of a workshop Held at ILRAD, 21-24 August 1989)*. Nairobi, Kenya: International Laboratory for Research on Animal Disease, pp 161-162.
- Aliu YO, Mamman M, Peregrine AS, 1993. Pharmacokinetics of Diminazene In Female Boran (*Bos indicus*) Cattle. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* ; 16 (3): 291-300.
- Aliu YO and Ødegaard S, 1983. Paired-Ion Extraction and High Performance Liquid Chromatographic Determination of Diminazene in plasma. *J. of Chromatogr.*, 276 : 218-223.
- Aliu YO and Ødegaard S, 1985. Pharmacokinetics of Diminazene In Sheep. *J. Pharmacokinetic Biopharm.*, Apr ; 13 (2) : 173-184.
- Allen L, Kimura K, MacKichan, Ritschel WA, 1982. *Manual of Symbols, Equations and Definitions in Pharmacokinetics*. Final Revision, Spring (May) 1982 : Committe on Pharmacokinetic Nomenclature of the American College of Clinical Pharmacology, Philadelphia, Pennsylvania.
- Artama WT, Sardjono B, Trini S, Rini W, 1992. *Produksi Antibodi Monoklonal Terhadap Antigen Permukaan Trypanosoma evansi*. Laporan Akhir hasil Penelitian. Yogyakarta: Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Gadjah Mada. hlm 3-25.
- Askandar T, Widodo JP, Soehartono TP, 1995. *Metodologi Penelitian Kesehatan*. Surabaya: Airlangga University Press, hlm 46-49.
- Bacchi CJ, Vargas M, Rattendi D, Goldberg B, Zhou W, 1998. *Antitrypanosomal Activity of A New Triazine Derivative, SIPI 1029, In Vitro and In Model Infections*. *Antimicrobial Agent and Chemotherapy*, Oct; 42 (10) : 2718-2712.

- BAKITWAN, 1983. BAKITWAN PROJECT (Report Development of Serological Assay for Studies on Trypanosomiasis of Livestock in Indonesia). Balai Penyakit Hewan, Direktorat Jenderal Peternakan, Departemen Pertanian, Jl. RE Martadinata, Bogor, hlm 44-47.
- Balai Karantina Hewan Ujung Pandang, 1999. Pemantauan daerah sebar hama dan peyakit hewan karantina : Trypanosomiasis/ Penyakit Surra. Dalam (Balai Karantina Hewan Ujung Pandang, ed). Seminar Uji Coba dan Pemantauan Daerah Sebar Penyakit Hewan Karantina di Balai, Stasiun dan Pos Karantina Hewan Seluruh Indonesia (Yogyakarta 31-1 1999 s/d 3-21999). Ujung Pandang balai Karantina Hewan, Ujung Pandang, hlm 4-11.
- Balai Penelitian Veteriner – Pusat Penelitian dan Pengembangan Peternakan, 1993. Studi tentang Trypanosoma evansi di Indonesia. Dalam (Proyek kerjasama BALITVET-ODA, ed). Seminar Hasil Penelitian Penyakit Darah dan Ruminansia Besar di Indonesia, Bogor 12 Mei 1993. Jl. RE Martadinata 65 Bogor, Indonesia : BALITVET, hlm 20-27.
- Beally KA, Connor RJ, Rowlands GJ, 1996. Trypanosoma in Goats in Zambia. Departement of Veterinary and Tsetse control Services, Chipata, Zambia : ILRI, Nairobi (Kenya)., pp 1-88.
- Black SJ, Wang Q, Makadzange T, Li YL, Van Praagh A, Loomis M, Seed JR, 1999. Anti-Trypanosoma brucei activity of nonprimate zoo sera. Journal Parasitology, Feb; 85 (1): 48-53.
- Blood DC, Radostits OM, Arundel JH, Gay GC, 1986. Veterinary Medicine. 7th ed. 24-28, Oval Road London NW1 7DX: Baillière Tindall. pp 1463-1464.
- Boczon K, 1995. Contemporary Strategies and Methods of Modeling Antiparasitic Drugs. Wiad. Parazytol., 41 (1): 43-52.
- British Veterinary Association, 2001. Drugs Used In The Treatment of Bacterial, Fungal, Viral and Protozoal Infections. In (Yolande Bishop, ed). The Veterinary Formulary. 5th edition. 1 Lambeth High Street, London SE1 7 JN, UK : Pharmaceutical Press. pp 135-218
- Brooks DL, Tillman PC, Niemi SM, 1984. Ungulates as Laboratory Animals. In (Fox JG, Cohen BJ, Loew FM, eds). Laboratory Animal Medicine. San Diego, California 92101 : Academic Press, Inc. pp 274-289.

- Brun R, Bühler Y, Sandmeier U, Kaminsky R, Bacchi CJ, Rattendi D, Lane S, Croft SL, Snowdon D, Yardley V, Caravatti G, Frei J, Stanek J, Mett H, 1996. In vitro Trypanocidal Activities of New S-Adenosylmethionine Decarboxylase Inhibitors. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. June; 40 (6): 1442-1447.
- Buckner FS, Verlinde CLMJ, La Flamme AC, Van Voorhis WC, 1996. Efficient Technique for Screening Drugs for Activity Against *Trypanosoma cruzi* Using Parasites Expressing β -Galactosidase. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. Nov; 40 (11): 2592-2597.
- Budavari S, O'Neil MJ, Smith A, Heckelman PE, eds, 1989. *The Merck Index : An encyclopedia of chemical drugs and biologicals*. 11th edition. Ran way, New Jersey, USA: Merck and Co., Inc., pp 3261.
- Cattand P, Miezian BT, De Raadt P, 1988. Human African Trypanosomiasis: use of double centrifugation of cerebrospinal fluid to detect trypanosomes. *Bull. WHO*, 66 (1): 83-86.
- Clarke EGC, 1971. *Isolation and Identification of Drugs : In Pharmaceuticals, Body Fluids and Post-mortem Material*. 1st Published 1969 (Reprint 1971). London : The Pharmaceutical Press, pp 313.
- Clarkson AB Jr, Bienen EJ, Pollakis G, Saric M, McIntosh L, Grady RW, 1989. Trypanosome Alternative Oxidase. In (Peregrine AS, ed). *Chemotherapy for Trypanosoma (Proceeding of a workshop Held at ILRAD, 21-24 August 1989)*. Nairobi, Kenya: International Laboratory for Research on Animal Disease, pp 44-48.
- Clausen PH, Waiswa C, Katunguka-Rwakishaya E, Schares G, Steuber S, Mehlitz D, 1999. Polymerase chain reaction and DNA probe hybridization to assess the efficacy of Diminazene treatment in *Trypanosoma brucei*-infected cattle. *Parasitol. Res.* 85: 206-211.
- Coles EH, 1986. *Veterinary Clinical Pathology*. 4th edition. The Curtis Center Independence Square West, Philadelphia, PA 19106, USA: WB Saunder Company, pp 56-141.
- Cotran S, Kumar V, Ollins T, 1999. *Robbins : Pathology basic of Disease*. 6th edition. Philadelphia : WB Saunders Comp., pp 1-25.
- Cross GAM, 2001. African Trypanosomes In The 21st Century : What is Their Future in Science and In Health ? In. *J. for Parasitol.*, 31 : 427-433.

- D'Alessandro-Bacigalupo A and Saravia NC, 1992. *Trypanosoma rangeli*. In (Kreier JO and Baker JR, Eds). *Parasitic Protozoa*. 2nd edition, 2nd Volum. 1250 Sixth Avenue, San Diego, California 92101-4311, USA : Academic Press. Inc, pp 1-25.
- Davison HC, Husein A, Muharsini S, Thrusfield MV, Rae PF, Partoutomo S, Luckin AG, 1996. Evaluation of *Trypanosoma evansi* Antigen-Elisas II: A) Field Studies - B) Data Analysis. In (Husein A, Davison HC, Luckin AG, Partoutomo S, Thrusfield MV, eds). *Proceedings of a Seminar on Diagnostic Techniques for Trypanosoma evansi in Indonesia*, Bogor January 10th 1996. Bogor : Research Institute for Veterinary Science. pp 29-33.
- De Souza W, 1989. Components of The Cell Surface of Trypanosomatids. *Prog. Protistol.* 3 : 87-184.
- De Souza W, 2002. From The Cell Biology to Development of New Chemotherapeutic Approaches Against Trypanosomatids : Dreams and Reality. *Kinetoplastid and Biology Disease*, 1 (3): 1-52.
- Dinas Peternakan Propinsi Jawa Timur, 1998. *Situasi Penyakit Hewan di Jawa Timur Tahun 1998*. Dinas Peternakan Propinsi Jawa Timur, Jl. Ahmad Yani, Surabaya, hlm 1-10.
- Direktorat Kesehatan Hewan, 1985. *Indeks Obat Hewan Indonesia*. Edisi I. Direktorat Kesehatan Hewan, Direktorat Jenderal Peternakan, Departemen Pertanian, Republik Indonesia-Jakarta, hlm 56.
- Direktur Bina Kesehatan Hewan, 1999. *Manual Standard Diagnostik Penyakit Hewan*, Jakarta : Direktorat Jenderal Peternakan, Departemen Pertanian Republik Indonesia bekerja sama dengan Japan International Cooperation Agency, hlm 69.
- Docampo R, 2001, Biphosphonates as Chemotherapeutic Agents Against Trypanosomatid and Apicomplexan parasites. *Curr. Pharmaceut.* December, 7 : 1157-1164.
- Donelson JE, 1988. Unsolved Mysteries of Trypanosome Antigenic Variation: In (Englun PT, Sher A, eds). *The Biolog of Parasitism A Molecular and Immunological Approach*. New Yor : Alan R Liss, Inc. pp 371-400.
- Duncan JR, Prasse KW, 1986. *Veterinary Laboratory Medicine : Clinical Pathology*. 2nd edition. Ames, Iowa, USA: Iowa States University Press. pp 232-233.

- Editor's office of *Veterinarski Arhiv*, 2001. Instruction for Authors. *Veterinarski Arhiv*. 71 (6) : 397-398.
- Edwards G and Breckenridge AM, 1988. Clinical Pharmacokinetics of Anthelmintic Drugs. *Clinical Pharmacokinetics*. 15: 67-93.
- Eisler MC, 1996. Pharmacokinetics of The Chemoprophylactic and Chemotherapeutic Trypanocidal Drug Isometamidium Chloride (Samorin) in Cattle. *Drug Metab. Dispos.*, Dec; 24(12): 1355-1361.
- El Banna HA, Abo el-Soud K, Soliman GA, 1999. Comparative Pharmacokinetics of Diminazene In Lactating Goats and Sheep. *Zentralbl. Veterinarmed*. Feb; 46(1):49-57.
- Enyaru JCK, Matovu E, Lubega GW, Kaminsky R, 1998. Response of a *T. b. rhodensiense* Stock With Reduced Drug Susceptibility In Vitro to Treatment in Mice and Cattle. *Acta Trop*. 69: 261-269.
- Fabre J and Balant J, 1983. Renal Failure, Drug Pharmacokinetics and Drug Action. In (Gibaldi M and Prescott L, eds). *Handbook of Clinical Pharmacokinetics*. 404 Sydney Road, Balowlah, NSW 2093, Australia : AIS Health Science Press. pp 212-234.
- Fairclough R, 1963. Observation on The Use of Berenil Against Trypanosomiasis of Cattle in Kenya. *The Veterinary Record*. 75 (43) 1107-1112.
- Farmakope Veteriner Indonesia, 2001. Edisi 1. Jakarta : Direktorat Jenderal Peternakan, Departemen Pertanian, Republik Indonesia., pp 1-30.
- Fouda HG, 1977^a. Determination of Diminazene In Plasma by High-Performance Liquid Chromatography. *J. Chromatogr. Sci.*, November ; 15: 537-538.
- Fouda HG, 1977^b. Gas Chromatography Chemical Ionization Mass Spectrometric Analysis of Diminazene aceturate In Plasma. *Biomed. Mass Spectrum*. 5: 72-75.
- Funk W, Dammann V, Donnevert G, 1992. Qualitätssicherung in der Analytischen Chemie. VCH.
- Gibson W, 2003. Species Concepts for Trypanosomes : From Morphological to Molecular Definitions ? *Kinetoplastid Biology and Diseases*. 2 (10): 1-14.

- Gibson GG, Skett PF, 1984. *Intrduction to Drug Metabolism*. Chapman and Hall, London. pp 1-38.
- Gilbert RJ, 1983. Studies In Rabbits on Disposition and Trypanocidal Activity of The Anti-trypanosomal Drug, Diminazene aceturate (Berenil). *Br. J. of Pharm.* 80 : 133-139.
- Gilbert RJ, Newton BA, 1982. Pharmacokinetics and Efficacy of The Trypanocide Diminazene aceturate (Berenil) In Rabbits. *The Veterinary Record*. Oct; 111: 397.
- Gobert AP, Semballa S, Daulouede S, Lesthelle S, Taxile M, Veyret B, Vincendeau P, 1998. Murine Macrophages Use Oxygen-and Nitric Oxide-Dependent Mechanisms To Synthesize S-Nitroso-Albumin and to Kill Extracellular Trypanosomes. *Infection and Immunity*. Sept; 66 (9): 4068-4072.
- Greene CE, Latimer K, Hopper E, Shoemaker G, Lower K, Cullens F, 1999. Administration of Diminazene Aceturate or Imidocarb dipropionate for Treatment of Cytauxzoonosis In Cats. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, Aug ; 215 (4) : 497-500.
- Gummow B, 1993. A Bioequivalence Evaluation of Two Commercial Diminazene aceturat Formulations Administered Intramuscularly to Cattle. *M. Med. Vet. (Thesis)*, University of Pretoria, South of Africa.
- Gummow B, Swan GE, Du Preez JL, 1994. A Bioequivalence and Pharmacokinetic Evaluation of Two Comercial Diminazene aceturate Formulations Administered Intramuscularly to Cattle. *Onderstepoort J. Vet. Res.* 61 (4) : 317-326.
- Gummow B, Swan GE, DU Preez JL, 1995. Paired-Ion Extraction and High-Performance Liquid Chromatography Determination of Diminazene in Cattle Plasma : a Modified Method. *Onderstepoort J. Vet. Res.*, Mar ; 62 (1) : 1-4.
- Hakim L, Suhardjono D, Hakim AR, Nugroho AE, Purwantiningsih, 2002. Studi Perbandingan Bioavailabilitas Antijamur pada dua sediaan Itrakonazol. *Medika*, 4 (XXIX): 228-233.
- Hartmann C, Massart DL, Mc Dowall, 1994. An Analysis of The Washington Conference Report on Bioanalytical Method Validation. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 12 (11):1337-1343.
- Hekman P and Van Ginneken AM, 1982. Kinetic Modeling of The Renal Excretion of Iodopyracet In The Dog. . *J. Pharmacokinetic Biopharm.* 10 (1) : 77-92.

- Hoechst, 1999. Berenil® For Veterinary Use : Product Information. Hoechst Roussel Vet. Pvt, Ltd. Needa Park, Airport Road, Yerwada, Pune - 411 006, India. 2-11.
- Hollands C, 1986. The Animal (Scientific Procedures) Act 1986. Lancet Juli : 32-33.
- Homeida AM, El Amin EA, Adam SEI and Mahmoud MM, 1981. Toxicity of Diminazene aceturate (Berenyl) to Camels. J. Comp. Path. , 91 : 355-360.
- Jenner P, Testa B, 1976. Drug Metabolism : Chemical and Biochemical Aspect. New York and Basel : Marcel Dekker Inc., pp 127-130.
- Kageruka P, Kabore H, Marcotty T, Ibouesse F, De Deken R, Grets S, Lemmouchi Y, Schacht E, 1996. Comparative Evaluation of The Prophylactic Effect of Slow Release Devices Containing Homidium bromide and Isometamidium on Trypanosoma congolense In Rabbits. Veterinary Parasitol., 63 : 179-185.
- Kaminsky R, Brun R, 1998. In Vitro and In Vivo Activies of Trybizine Hydrochloride Against Various Pathogenic Trypanosome Species. Antimicrobial Agent and Chemotherapy, Nov; 42 (11) : 2858-2862.
- Kaminsky R, Chuma F, Wasike RPN, 1994. Time-dose Response of Trypanosoma congolense Bloodstream Form to Diminazene and Isometamidium. Vet. Parasitol., 52 : 235-242.
- Kaminsky R and E. Zweygarth, 1989. Feeder Layer-Free In Vitro Assay for Screening Antitrypanosomal Compounds Against T. b. brucei and T. b. evansi. Antimicrob. Agents Chemother. 33 : 881-885.
- Kanmogne GD, Asonganyi T, Gibson WC, 1996. Detection of Trypanosoma brucei gambiense, In Serologically Positive but Aparasitaemic Sleeping-Sickness Suspect In Cameroon, by PCR. Annals of Tropical Medicine and Parasitology. 90 (5): 475-483.
- Keddie JR, 1990. Safety In The Use of Animal Models for AIDS. In (Schellekens H, Horzinek MC, eds). Animal Models In AIDS. 1000 AE Amsterdam, The Netherlands : Elsevier Science Publishers BV, pp 41-45.
- Kennedy CR, 1975. Ecological Animal Parasitology. 85 Marylebone High Street, London W1M 3DE : Black Well Scientific Publication, pp 13-60.

- Kinabo LD, McKellar QA, Eckersall PD, 1991. Isometamidium In Pigs: Disposition Kinetics, Tissue Residues and Adverse Reaction. *Res. Vet. Sci.*, 50 : 6-13.
- Klatt P, Hajdu P, 1976. Pharmacokinetic Investigations on Diminazene and Rolietracycline In Comparison to a Combintion of Booth. *Vet. Rec.*, 99: 372-374.
- Klecker RW, Collins JM, 1985. Quantification of Suramin by Reverse-Phase Ion-Pairing High-Performance Liquid Chromatography. *Journal of Liquid Chromatography* 8 (9): 1685-1696.
- Klotz U, 1983. Pathophysiological and Disease-Induced Changes in Drug Distribution Volume : Pharmacokinetic Implication: In Milo Gibaldi and Laurie Prescott. Eds, *Hand Book of Clinical Pharmacokinetics*. New York : ADIS Health Science Press, pp 41-56.
- Koesdarto S, 1998. Peran Mobilitas Sapi Terhadap Infeksi Trypanosomiasis pada Sapi Melalui Pendekatan Serologik di Pulau Madura : Ringkasan Disertasi, Program Pascasarjana Universitas Airlangga, Surabaya, pp 1-26.
- Lanham SM, 1968. Separation of Trypanosomes From The Blood of Infected Rats and Mice by Anion-exchangers. *Nature*. 29th June, 218 : 1273-1274.
- Lazuardi M, 1994. Potensi Terapi Suramin Terhadap Trypanosomiasis dan Ketersediaan hayatinya. Tesis, Universitas Airlangga, Jl. Dharmawangsa Dalam Selatan Surabaya, hlm 20-70.
- Lazuardi M, 1997^a. Studi Farmakogenetik Suramin Pada Tikus Yang Terinfeksi Tripanosomiasis Melalui Pelackan Profil Farmakokinetik Klinik. *Media Kedokteran Hewan UNAIR*, 13 (2) : 83-90.
- Lazuardi M, 1997^b. Perbandingan Pengecatan Cepat Antara Pewamaan Acridine Orange dengan Giemsa Terhadap Trypanosoma evansi. *Ebers Papyrus*. 3 (3) : 145-150.
- Lazuardi M. 1997^c. Studi Farmakodinami (Post Marketing Surveillance) Suramin Pada Tikus Terinfeksi Tripanosomiasis. *Medika*, Juli 7 (XXIII): 533-538.
- Lazuardi M, 1998. The Trypanocide Effect of Suramin Against Trypanosoma evansi. *Maj. Parasitol. Ind.*, Jan; 11 (1) : 26-32.

- Lazuardi M, Soepartono P, 1999. Studi Farmakogenetik Suramin Pada Sapi Peranakan Ongole dan Sapi Madura. *Jurnal Penelitian Univ. Airlangga*, Agustus ; 7 (2) : 34-41.
- Lazuardi M, 2000. Pharmacokinetic Study of Suramin in Ongole and Madura Cattle Breed. Article in 3rd Internet Conference on Salivarian Trypanosoma and Other Trypanosomiasis (TICSTT 2nd to 18th of October 2000). Veterinary Pharmacy Laboratory, Veterinary Faculty Airlangga University Jl Mulyorejo Surabaya Indonesia, Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brazil and Northwestern University, Chicago.
- Le NM, Wuyts N, Luckins AG, Nguyen AD, Nguyen TG, 1998. Drug sensitivity of *Trypanosoma evansi* And The Use of Immunoassays In Diagnosing Infections with *T. evansi* in buffaloes in Vietnam. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, Jun ; 849 : 188-94.
- MacLeod G, Rowland AG, Sewell MMH, 1981. Post Mortem Examination Procedures. In (Robertson A, ed), *Handbook of Tropical Veterinary Laboratory Diagnosis*. Bristol Square, Edinburgh EH 9AL: EUSA, pp 1-8.
- Mamman M, Aliu YO, Peregrine AS, 1993. Comparative Pharmacokinetics of Diminazene In Noninfected Boran (*Bos indicus*) Cattle and Boran Cattle Infected With *Trypanosoma congolense*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, May; 37 (5): 1050-5.
- Mamman M, Gettinby G, Murphy NB, Kemei S, Peregrine AS, 1995^a. Frequency of Diminazene-resistant trypanosomes in populations of *Trypanosoma congolense* arising in infected animals following treatment with Diminazene aceturate. *Antimicrob. Agents Chemother.*, May ; 39 (5) : 1107-1113.
- Mamman M, McKeever DJ, Aliu OY, Peregrine AS, 1996. Pharmacokinetics of Diminazene In Plasma and Lymph of Goats. *Am. J. Vet. Res.* 57 (5) : 710-714
- Mamman M, Peregrine AS, 1994. Pharmacokinetics of Diminazene In Plasma and Cerebrospinal Fluid of Goats. *Res. Vet. Sci.*, Sep ; 57 (2) : 253-5.
- Mamman M, Williams DJ, Murphy NB, Peregrine AS, 1995^b. Apparent Rarity of Diminazene-resistant Trypanosomes In goats Infected with a Diminazene-resistant Population of *Trypanosoma congolense*. *Res. Vet. Sci.*, Mar ; 58 (2) : 113-8.

- Martinez MN, 1998. Special Series-Use of Pharmacokinetics in Veterinary Medicine, Article IV: Clinical application of pharmacokinetics. J. Am. Vet. Med. Assoc., Nov; 213 (10): 1418-1420.
- Mc Pherson WC, 1984. Law, Regulations, and Policies Affecting the Use of Laboratory Animals. In (Fox JG, Cohen BJ, Loew FM, eds). Laboratory Animal Medicine. San Diego, California 92101 : Academic Press, Inc., pp 19-30.
- Mdachi RE, Murilla GA, Omukuba JN, Cagnolati V, 1995. Disposition of Diminazene aceturate (Berenil[®]) In Trypanosome-infected pregnant and Lactating cows. Vet. Parasitol., 58 : 215-225.
- Medina EA, Ventura FA, Champalimaud JL, 1986. Computer-asisted tomographic findings in a patient with African trypanosomiasis. Journal of Tropical Medicine and Hygiene. 89: 75-77.
- Mercer DH, 1984. Calculation of Dosage Regimens of Antimicrobial Drugs for Surgical prophylaxis. J. Am. Vet. Med. Assoc., Nov; 185 (10): 1083-1088.
- Merck Veterinary Manual, 2003. Part I. Blood Lymphatic and Cardiovascular System, Part II Toxicology. 9th Eds., Rahway, New Jersey, USA : Merck and Co., Inc., pp 19 –995.
- Meyer DJ, Harvey JW, 1998. Veterinary Laboratory Medicine, Interpretation and Diagnosis. 2nd Ed. The Curtis Center, Independence Square West, Phyladelphi, Pennsylvania, 1910 : WB Saunders Company, hlm 157-282.
- Moffat AC, 1986. Clarke's Isolation and Identification of Drugs : in pharmaceuticals, body fluids, and post mortem material. 2nd edition. Great Britain : The pharmaceutical press, pp 555.
- Morris JC, Drew ME, Klingbeil MM, Motyka SA, Saxowsky TT, Wang Z, Englund PT, 2002. Replication of KDNA : An Update for the New Millennium. Article in Third Internet Conference on Salivarian Trypanosoma and other Trypanosomiasis (TICSTT October 2002). Department of Biological chemistry, Johns Hopkins Medical School, Baltimore, MD 21205, USA.
- Moser DR, Cook GA, Diane EO, Bailey CP, McKane MR, Donelson JE, 1989. Detection of Trypanosoma congolense and Trypanosoma brucei subspecies by DNA Amplification Using The Polymerase Chain Reacton. Parasitology. 99: 57-66.

- Nanizar Zaman-Joenoes, 1998. *Ars Praescribendi : Resep Yang Rasional*. Jilid 2. Surabaya : Airlangga University Press., hlm 50-150.
- Notari RE, 1987. *Biopharmaceutic and Clinical Pharmacokinetics*. 14th edition. Marcel Dekker, Inc. New York.
- Nuraini F dan Lazuardi M, 1997. *In Vitro Effects of Antiproliferative Suramin Towards Myeloma cells*. *Jurnal Kedokteran Yarsi*. Sept; 5 (3): 32-60.
- Odika IE, Asuzu IU, Anika SM, 1995. *The Chemotherapeutic Efficacy of Diminazene aceturate and Lithium chloride Against Relapse Infection of Trypanosoma brucei In Rats*. *Trop. Med. Parasitol.*, Jun; 46 (2) : 99-102.
- Oliver JE, 1987. *Misdirected Aggression*. In (Lorenz MD, Comelius LM, eds) *Small Animal Diagnosis*. East Washington Square, Philadelphia, USA : JB Lippincott Company, pp 53-62.
- Opperdoes FR, Michels PAM, 2001. *Enzymes of Carbohydrate Metabolism as Potential Drug Targets*. *International Journal for Parasitology* 31: 482-490.
- Paramjit K, Juyal PD, Srivastava AK, Bourdichon A, 2002. *Therapeutic Efficacy and Kinetik Pattern of Diminazene aceturate In Combination With Antipyrine and Procaine (Trypan) In Experimental Trypanosoma evansi Infection In Cow Calves*. Article in 4th Internet Conference on Salivarian Trypanosoma and other Trypanosomiasis (FICSTT October 2002). Departments of Veterinary Parasitology and Veterinary Pharmacology and Toxicology, College of Veterinary Science, Punjab Agricultural University, Ludhiana-141004 (Punjab), India. Instituto OswaldoCruz, Rio de Janeiro, Brazil and Northwestern University, Chicago.
- Partoutomo S, 1996. *Patogenesis Trypanosoma evansi Pada Kerbau Yang Diberi Ransum Bermutu Tinggi dan Rendah*. *Jurnal Ilmu Ternak dan Veteriner*. 2 (2): 137-144.
- Paul J, 1980, *Cell and Tissue culture*. 5th Eds, 2nd reprinted. USA : Churchill Livingstone (Medical Division of Longman Group Limited), pp 124-175.

- Pengurus Besar Perhimpunan Dokter Hewan Indonesia, 2003. The Workshop of International Concept on Animal Welfare With Reference to Indonesians Cases, Legislation and Curriculum in Surabaya Oct 17th -18th 2003. FKH UNAIR Jl. Mulyorejo, Surabaya: PB PDHI- FKH UNAIR.
- Peregrine AS and Mamman M, 1993. Pharmacology of Diminazene : A Review. *Acta Tropica*, 54 : 185-203.
- Peregrine AS, Ogunyemi O, Whitelaw DD, Holmes PH, Moloo SK, Hirumi H, Urquhart GM, Murray M, 1998. Factors Influencing The Duration of Isometamidium Chloride (Samorin) Prophylaxis Against Experimental Challenge With Metacyclic Forms of *Trypanosoma congolense*. *Vet. Parasitol.*, 28 (1-2): 53-64.
- Perschke H, Vollner L, 1985. Determination of The Trypanocidal Drugs Homidium, Isometamidium and Quinapyramine In Bovine Serum or Plasma Using HPLC. *Acta Trop.*, Sep; 42(3):209-216.
- Philips FS, Sternberg SS, Cronin AP, Sodergren JE, Vidal PM, 1967. Physiologic Disposition and Intracellular Localization of Isometamidium. *Cancer Research.*, February ;2 Part 1 : 333-349.
- Pope DG, Baggot JD, 1983. The Basic for Selection of the Dosage Form. In (Blodinger J, eds). *Formulation of Veterinary Dosage Form*. New York and Basel : Marcel Dekker, Inc. pp 1-70.
- Prastyawati IS, 1989. Blood Parasites of Large Ruminants : Sixth International Course in Diagnosis of Animal Diseases and Their Control Programme, Held at Diseases Investigation Centre, Medan January 23rd - March 24th 1989. Research Institute for Veterinary Science. PO. BOX 52 Bogor, Indonesia. 1-28.
- Prastyawati IS, Payne RC, Graydon R, 1988. Trypanosomiasis Di Madura : Survei Parasitologik dan Serologik. *Penyakit Hewan*, 20: 85-87.
- Prastyawati IS, Payne RC, Graydon R, 1992. Trypanosomiasis Di Madura : Survei Parasitologik dan Serologik. Seminar Hasil Penelitian Penyakit Parasit Darah pada Ruminansia Besar di Indonesia (Proyek kerjasama BALITVET-ODA). Bogor 12 Mei 1992. Balai Penelitian Veteriner dan Pusat Penelitian dan Pengembangan Peternakan. Jl. RE Martadinata 30 Bogor.
- Rabanal B, De Paz E, Merino G, Negro A, 2000. Determination by Capillary Zone Electrophoresis of Berenil, Phenamidine, Diampron and Dibromopropamidine In Serum and Urine. *J. Chromatogr. Biomed. Sci Appl.*, Feb; 738 (2) : 293-303.

- Radostits OM, Gay CC, Blood DC, Hinchcliff KW, 2000. *Veterinary Medicine : A Textbook of The Diseases of Cattle, Sheep, Pigs, Goats and Horses*. 9th edition. Harcourt Place, 32 Jamestown Road, London NW1 7BX : WB saunders Comp. Ltd, pp 3 - 13337.
- Raether W, Hajdu P, Seidenath H and Damm D. 1972. Pharmacokinetische und Chemopropylaktische Untersuchungen mit Berenil an Wistar-ratten (Trypanosoma rhodensiense-Infection). *Z. Tropenmed. Parasitol.*, 23: 418-427.
- Rahardjo. 1995. Uji pre-klinik tumbuhan obat Rapat Kerja Penelitian Tumbuhan Obat Indonesia 10-18 April 1985). Surabaya : Lembaga Penelitian Univ. Airlangga. hlm 1-9.
- Raina AK, Rakhesh Kumar, VS Rajora, Sridhar RP Sing, 1985. Oral Transmission of Trypanosoma evansi Infection In Dogs and Mice. *Vet. Parasitol.*, 18 : 67-69.
- Räz B, Iten M, Grether-Bühler Y, Kaminsky R, Brun R, 1997. The Almar Blue Assay to Determine drug sensitivity of African Trypanosomes (T.b. rhodensiense and T.b. gambiense) in vitro. *Acta Trop.* 68: 139-147.
- Ressang AA, 1984. *Patologi Khusus Veteriner*. Edisi 2. Denpasar, Bali : IFAF Project, Bali cattle Disease Investigation Unit, Denpasar, hlm 45-645.
- Ristchel WA, 1992. *Handbook of Basic Pharmacokinetics, Including Clinical Application*. 4th Ed. Drug Intelligency Publication, Inc. Hamilton, IL USA 62341, pp 193-344.
- Roostantia Indrawati, Lazuardi M, Ratna Sofaria Munir, 2000. The Comparison of Efficacy to Inhibit Myoloma Cell Between Benalu Duku and Teae Benalu. *Ebers Papyrus*. 6 (1) : 13-21.
- Roostantia Indrawati, Ratna Sofaria Munir, Lazuardi M, 2003. The Explored In Vitro Test of Tripamidium®. Laporan penelitian DIK RUTIN 2003. LEMLIT UNAIR Surabaya, hlm 23-29.
- Rowlands GJ, Mulatu W, Leak SG, Nagda SM, d'leteren GD, 1999. Estimating The Effects of Tsetse Control on Livestock Productivity : A Case Study In South Ethiopia. *Trop. Anim. Health Prod.*, Oct ; 31 (5): 279-294.

- Rukmana, M.P, 1979. Metode Hematokrit Sebagai Teknologi Baru Diagnosa Surra dan Relevansi Kaitannya Dengan Sosial Ekonomi Peternakan. Disertasi. UNPAD. Bandung.
- Santoso B, 1991. Farmakogenetik : Kursus singkat genetika biokimia 29 hingga - 24 Agustus 1991. PAU Bioteknologi, UGM, Yogyakarta.
- Saunders BD and Trapp RG, 1994. Basic and Clinical Biostatistics. 2nd Ed. Prentice-Hall International Inc., pp 82-98.
- Saunders L and Fleming R, 1971. Mathematics and Statistics (for use in the Biological and Pharmaceutical science). 2nd Ed. 17 Bloomsbury Ssquare WCIA 2NN, London : The Pharmaceutical Press., pp 224-226
- Seed JR, 2001. African Tripanosomiasi Research : 100 Years of Progress, But Questions and Problems Stiil Remain. International Journal for Parasitology, 31 434-442.
- Seed JR and Hall JE, 1992. Trypanosomes Causing Disease in Man in Africa. In Kreier JO and Baker JR. Eds. Parasitic Protozoa. 2nd edition, 2nd volum. 1250 Sixth Avenue, San Diego, California 92101-4311, USA : Academic Press, Inc., pp 104-107.
- Shargel L and Yu ABC, 1999. Applied Biopharmaceutics and Pharmacokinetics. 4th Ed. Appleton and Lange, 25 Van zant Street, east Norwalk, Connecticut, USA 06855.
- Silayo RS, Mamman M, SK Mooloo, YO Aliu, MA Gray, AS Peregrine, 1992. Response of *Trypanosoma congolense* in goats to single and double treatment with Diminazene aceturate. Res. in Vet. Sci., 53 : 98-105.
- Soebito S, Watimena JR, 1987. Dasar-Dasar Farmakokinetik-Farmakodinami. Jl. Ganesha Bandung : PAU ITB. hlm 160-161.
- Soeharmi S, Haryanto H, Lazuardi M, 2002. Pemeriksaan Histopatologi Organ dalam Kambing Pasca Kematian Akibat Infeksi *Trypanosoma evansi* Isolat Bangkalan. Laporan Penelitian DIK Suplemen UNAIR Tahun 2002/2003. LEMLIT UNAIR, hlm 1-35.
- Solihat L, Rae PF, Nuharsini S, Davison HC, 1996. The Card Agglutination Test (CATT) for *Trypanosma evansi*. In (Husein A, davison HC, Luckins AG, partoutomo S, Thrusfield MV, eds). Proceedings of a seminar on diagnostic techniques for *Trypanosoma evansi* in Indonesia (Bogor, January 10th 1996). Bogor: Research Institute for Veterinary Science, Agency for Agricultural Research and Development, pp 50-53.

- Soulsby EJJ, 1986. *Helminths, Arthropods and Protozoa of Domesticated Animals*. 17th edition. London : Baillière Tindall, pp 514-542.
- Stothard JR, Frame IA, Miles MA, 1997. Use of Polymerase Chain Reaction-Based Single Strand Conformational Polymorphism and Denaturing Gradient Gel Electrophoresis Methods For Detection of Sequence Variation of Ribosomal DNA of *Trypanosoma cruzi*. In. *J. for Parasitol.* 27 (33): 339-343.
- Sudarto MW, Tabet H, Haines DM, 1990. Immunohistochemical Demonstration of *Trypanosoma evansi* In Tissues of Experimentally Infected Rats and a Naturally Infected Water Buffalo (*Bubalus Bubalis*). *J. Parasitol.* 76 (2): 162-167.
- Sudjana, 1992. *Metode Statistika*. Edisi 5. Bandung : Penerbit Tarsio, hlm 14-84.
- Sumartono, 1995. Studi Perkembangbiakan *Trypanosoma evansi* in vitro. *Bul. FKH-UGM*. July; XIV (1): 112-122.
- Supko JG, Malspeis L, 1990. A Rapid Isocratic HPLC Assay of Suramin (NSC 34936) In Human Plasma. *J. of Liq. Chromatogr.* 13 (4): 727-741.
- Sutherland IA, Mounsey A, Holmes PH, 1991. Effect of Isometamidium on *Trypanosoma congolense* infectivity. *Vet. Parasitol.*, Jul; 38 (1-2): 13-17.
- Tanuri A, De Andrade PP, De Almeida DF, 1985. *Trypanosoma cruzi* : Isolation of Cloned Strains and Characterization of Their Infectivity. *J. of Parasitol.* 71 (4): 397-402.
- Testa B, Jenner P, 1976. *Drug Metabolism : Chemical and Biochemical Aspect*. Marcel Dekker, New York and Basel. pp 3-116.
- Tetty JNA, Skellern GG, Grant MH, Midgley JM, 1999. Investigation of The Chemical Equivalence of The Trypanocidal Products, Samorin[®] and Veridium[®]. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, Jan;1 (2):1-7.
- Tetty JNA, Skellern GG, Midgley JM, Grant MH, 1998. HPTLC and HPLC Determination of Isometamidium In The Presence of Its Manufacturing and Degradation Impurities. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 17 (4-5) : 713-718.
- The manual of tropical veterinary parasitology, 1990. Institut d'Élevage et de Médecine Vétérinaire des Pays Tropicaux, Technical Centre for Agricultural and Rural Cooperation, . London : Published by CAB International, pp 181-298.

- The Program Against African Trypanosomiasis, 1996^a. The Program Against African Trypanosomiasis (PAAT) : Meeting Report, 15-17 October 1996. Nairobi. FAO of United Nation, Inter – Africa Bureau for Animal Resources of the Organisation for Africa Unity, International Atomic Energy Agency of the United Nation, WHO of the United Nation. Advisor Group Vcoordinators, OAU/IBA, PO BOX 3078, Nairobi Kenya.
- The Program Against African Trypanosomiasis, 1996^b. The Program Against African Trypanosomiasis (PAAT) Second Programme Committee : Meeting Report, 4-5 December 1996. Rome, Italy. FAO of United Nation, Inter – Africa Bureau for Animal Resources of the Organisation for Africa Unity, International Atomic Energy Agency of the United Nation, WHO of the United Nation: Chairman of The Programme Committee, P.Holmes, University of Glasgow, Bearsden Road, Glasgow G61 1QH, Scotland.
- Thomson MW, McInnes RR, Willard HF, 1991. Genetics in Medicine. 5th edition. W,B Saunders Comp. Philadelphia, PA 19106-3399, pp 298-301.
- Trent JO, Clark GR, Kumar A, Wilson WD, Boykin DW, Hall JE, Tidwell RR, Blagburu BL, Neidle S, 1996. Targeting The Minor Groove of DNA : Crystal Structures of Two Complexes Between furan Derivatives of berenil and the DNA Dodecamer d(CGCGAATTTCGCG)2. J. Med. Chem., Nov; 39 (23) : 4554-4562.
- Urquhart GM, Armour R, Duncan JL, Dunn AM, Jenings FW, 1994. Veterinary Parasitology. Reprinted 1994. Singapore : Longman Singapore Publisher Ptc Ltd., pp 203-213
- Van den Bossche P, Doran M, Connor RJ, 2000. An Analysis of Trypanocidal Drug Use In The Eastern Province of Zambia. Acta Trop. Mar ; 75 (2) 247-258.
- Victor MG, Miguel AF, Antonio JR, Carlos A, José MP, 1999. The Formation of DNA Interstrand Cross-Links by a Novel Bis-[Pt2Cl4(Diminazene aceturate)2]Cl4.4H2O complex Inhibits the B to Z Transition. Mol. Pharm., 55 (4) : 770-777.
- Wagner J, 1975. Fundamentals of Clinical Pharmacokinetics. 1st Edition, Illionis, USA. Drug Intelligence Publication, Inc., pp 57-331.

- Wardiarto DP, 1983. Efikasi Berenil dan Naganol terhadap *Trypanosoma evansi* isolat Jawa Tengah (1969) pada Domba yang di-awak-limpakan (splenectomized). Proyek Pengembangan Ilmu dan Teknologi DEPDIBUD, Jakarta : LEMLIT UGM., pp 1-30.
- Welde BT, Reardon MJ, Chumo DA, Muriithi RM, Towett S, Mwangi J, 1989. Experimental Infection of Goats with *Trypanosoma brucei* spp. and effects of Treatment with Suramin and Mel-B. *Annals of Trop. Med. and Parasitol.* 83 (1): 161-169.
- Whitelaw DD, Bell IR, Holmes PH, Moloo SK, Hirumi H, Urquhart GM, Murray M, 1986. Isometamidium Chloride Prophylaxis Against *Trypanosoma congolense* Challenge and The Development of Immune Responses in Boran Cattle. *Vet. Rec.*, 118 (26): 722-726.
- Wilcocks C and Manson-Bahr PEC, 1972. *Manson's Tropical Diseases*. 17th edition. London: Bailliere and Tindall, pp 953-959.
- World Health Organization, 1976. Parallel Evaluation of Serological Test Applied in Africa Trypanosomiasis : a WHO collaborative study. *Bull. World Health Organ.* 51: 141-147.
- World Health Organization, 1992. *Metodologi Penelitian Kesehatan (Penuntun Latihan Metode Penelitian)*. Cetakan 1999. Pusat Penelitian Penyakit Tidak Menular, DEPKES RI, hlm 83-159.
- Yamaoka K, Nakagawa T, Uno T, 1978. Application of Akaike's Information Criterion (AIC) in the Evaluation of Linear Pharmacokinetic Equation. *J. of Pharmacokinetics and Biopharm.* 6 (2) : 165-175.
- Zar JH, 1984. *Biostatistical Analysis*. 2nd ed. Englewood Cliffs, New-Jersey 07632 : Prentice Hall., 14-679.
- Zhang X and Bourdichon AJ, 2002. The Pharmacokinetics and Tissue Residues of Diminazene, Diminazene-liposomes and TRYPAN in Rabbits. Article in 3rd Internet Conference on Salivarian *Trypanosoma* and other Trypanosomiasis (TICSTT October 2002), Departemen of Veterinary Preventive Medicine, Changchun University of Agriculture and Animal Science, China and Department of Research and Development of Pharmaceutical Drugs, Atarost-Sierichstr. 21, D.22301, Hamburg, Germany



PEMERINTAH KOTA SURABAYA
DINAS PEMANTAPAN PANGAN

JL. PAGESANGAN II No. 56 TELP./FAX. : (031) 8282328 SURABAYA 241

KETERANGAN HEWAN COBA KAMBING

No. 524/799/436.4.10/2004

1. Macam Hewan
 - 1.a Jenis : Kambing
 - 1.b Turunan : Peranakan Etawah
 - 1.c Umur : 1,5 – 2 tahun
 - 1.d Jenis Kelamin : Jantan
2. Status Kesehatan
 - 2.a Cacat fisik : Tidak terdapat
 - 2.b Pemeriksaan : Sehat
 - Kesehatan fenotip
 - 2.c Pemeriksaan : Parasit darah tak ditemukan
 - ulas darah.
3. Asal : Pengepul Ternak
 - Jl. Kedung Cowek VI (Kedinding Lor) Surabaya
 - Jl. Jemur Ngawinan 56 A Surabaya
4. Status Wilayah : Bebas Penyakit Surra
5. Lain – lain :

Surabaya, 12 Juli 2004

An. KEPALA DINAS PEMANTAPAN PANGAN
KOTA SURABAYA
Kepala Sub Dinas Peternakan


Drh. RETMANA GAYATRI

Pembina

NIP. 510 100 54

DEPARTEMEN PERTANIAN
DIREKTORAT JENDERAL BINA PRODUKSI PETERNAKAN

Jl. Harsono RM No. 3
Pasir Minggu Jakarta 12550
Kotak Pos 1108 / JKS, JAKARTA 12011

Telp. : (021) 7815580 - 83
Fax. : (021) 7815581
7815583

PUSAT VETERINARIA FARMA
Jalan Raya Jenderal A. Yani No. 68 - 70
SURABAYA 60231 Kotak Pos WO. 3
Telepon : (031) 8291124, 8291125
Fax : (031) 8291183

242

KETERANGAN HEWAN COBA TIKUS DAN MENCIT

No. 723/SR.140/F5/06.04

- | | | |
|-----|-----------------------|---|
| 1 | Macam hewan | |
| 1.a | Jenis | : Tikus |
| 1.a | Turunan | : <i>Rattus norvegicus strain Wistar</i> |
| 1.b | Umur | : 1 bulan |
| 1.c | Jenis kelamin | : Jantan |
| 2 | Status kesehatan | : |
| 2.a | Cacat fisik | : Tak terdapat kecacatan |
| 2.b | Pemeriksaan Kesehatan | : Sehat |
| 2.c | Sifat kanibal | : Tak ditemui |
| | | |
| 1 | Macam hewan | |
| 1.a | Jenis | : Mencit |
| 1.a | Turunan | : <i>Mus musculus albinos strain Balb-c</i> |
| 1.b | Umur | : 1 bulan |
| 1.c | Jenis kelamin | : Jantan |
| 2 | Status kesehatan | : |
| 2.a | Cacat fisik | : Tak terdapat kecacatan |
| 2.b | Pemeriksaan Kesehatan | : Sehat |
| 2.c | Sifat kanibal | : Tak ditemui |

Surabaya, 21 Juni 2004

KEPALA


Dth. SYAMSUL BAHRI SIREGAR, MSc.

NIP. 080 020 575

BALAI PENELITIAN VETERINER

Jalan R.E. Martadinata 30 Bogor 16114, Kotak Pos 151
Telepon : (0251) 334456, 331048
Fax. : (0251) 336425
E-mail : balivet@indo.net.id

243

Nomor : TN.260.0007.9.2.1455
Lampiran : -
Perihal : Permintaan isolat parasit

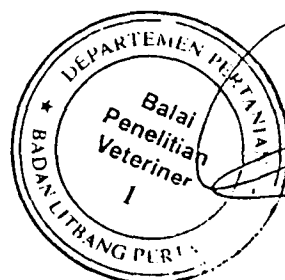
27 Juli 2000

Kepada Yth.
Prof. Dr. H. Pitono Soeparto. dr
Direktur Bidang Akademik
Program Pascasarjana
Universitas Airlangga
Jl. Dharmawangsa Dalam Selatan
Surabaya 60286

Sehubungan dengan surat Saudara pada tanggal 20 Juni 2000 Nomor : 1965/J03.11/PP/2000 yang kami terima tanggal 25 Juli 2000, maka dengan ini kami penuhi permintaan Saudara sbb :

- I. Isolat Parasit :
 1. Protozoa
 2. Genus : Trypanosoma
 3. Spesies : Trypanosoma evansi
 4. Isolat : Bangkalan
 5. No. Isolat : 87/649
- II. Dacrah asal penemuan :
 1. Pulau : Madura
 2. Kabupaten : Bangkalan
 3. Kecamatan : Bangkalan
 4. Desa : Bancaran
- III. Asal pengisolasian dari jenis hewan :
Ruminansia (Kerbau No. 191)
- IV. Waktu Isolat :
 1. Tanggal : 08
 2. Bulan : 08
 3. Tahun : 1988
- V. Hewan adaptan : Mencit putih Mhs musculus albinus
(12 kali pasase dengan waktu pasase tidak lebih dari 4 hari)
Catatan : Isolat tersebut disimpan dalam Bank Stabilat Balitvet dalam nitrogen cair.

Demikian agar menjadi maklum.



Kepala Balai Penelitian Veteriner

Dr. Darminto
NIP.080068072

Lampiran 3.1



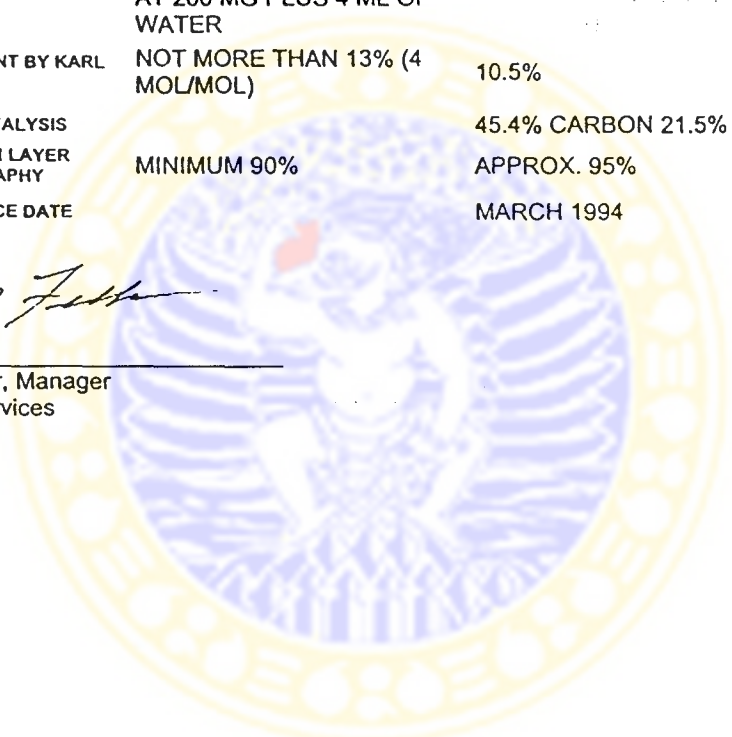
Certificate of Analysis

244

TEST	SPECIFICATION	LOT {122F00161} RESULTS
Product Name	Diminazene aceturate	
Product Number	D7770	
CAS Number	908543	
Formula	$C_{14}H_{15}N_7 \cdot 2C_4H_7NO_3$	
Formula Weight	515.5	
APPEARANCE	YELLOW WITH AN ORANGE CAST POWDER	YELLOW POWDER WITH AN ORANGE CAST
SOLUBILITY	CLEAR TO SLIGHTLY HAZY ORANGE SOLUTION AT 200 MG PLUS 4 ML OF WATER	VERY SLIGHTLY HAZY ORANGE SOLUTION AT 200 MG PLUS 4.0 ML OF WATER
WATER CONTENT BY KARL FISCHER	NOT MORE THAN 13% (4 MOL/MOL)	10.5%
ELEMENTAL ANALYSIS		45.4% CARBON 21.5% NITROGEN
PURITY BY THIN LAYER CHROMATOGRAPHY	MINIMUM 90%	APPROX. 95%
QC ACCEPTANCE DATE		MARCH 1994

David Feldker

David Feldker, Manager
Analytical Services



Lampiran 3.2

245

CERTIFICATE OF ANALYSIS

Analyse Zeugnis certificat d'analyse certificado de calidad

Hoechst Roussel Vet

Analytical Control
Production Unit
27400 Igoville - France

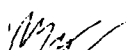
BERENIL GRANULES

Batch number : 03U057
 Production date : September, 10 1998
 Expiry date : August 2003
 Control number : 9VT0945
 Control date : November, 03 1999

Items	Results
Characters	Complies
Extractable mass	Complies
Identification	Positive
Visual aspect of the solution	Complies
Loss on drying	Complies
Unknown individuals impurities	Complies
Microbial contamination	Complies
Sum of all the impurities	Complies
1-(4-Amidinophenyl)-3-(4-carbamoylphenyl)- triazen	Complies
p-Nitrobenzamid estimation	Complies
p-Nitrobenzamidoxim estimation	Complies
p-Aminobezamid estimation	Complies
Phenazon content	555.5 mg p g
Phenazon identification	Positive
Diminazendiaceturat content	442.8 mg p g
Diminazendiaceturat identification	Positive
*	*
*	*
*	*
*	*
*	*
*	*
*	*
*	*
*	*

Conclusion : Accepted

Certificate Pharmacist :



Hoechst

Lampiran 4

246

Media Tioglikolat

Komposisi :

Sistein P	: 500 mg
Agar P	: 750 mg
Natrium klorida P	: 2,5 g
Glukose P	: 5,5 g
Ekstrak ragi P	: 5 g
Kasitin P	: 15 g
Na-Tioglikolat atau asam Tioglikolat	: 500 mg
Larutan segar Natrium	: Secukupnya
Resazurin P 1 % (b/v)	: 1 ml

Cara pembuatan :

- Komponen tersebut di atas dilarutkan dalam 1000 ml akuabidest
- Dilakukan pembebasan oksigen terlarut (ultrasonik 15 menit)
- Bagi dalam tube 15 ml
- Steril basah 121 °C 10 menit (pH 7,1 ± 0,2)
- Dinginkan hingga suhu 30 0C
- Sebelum digunakan tunggu 3 hari untuk menguji sterilitas dalam tube, bila steril siap digunakan (simpan dalam suhu sejuk 22 °C)

Keterangan :

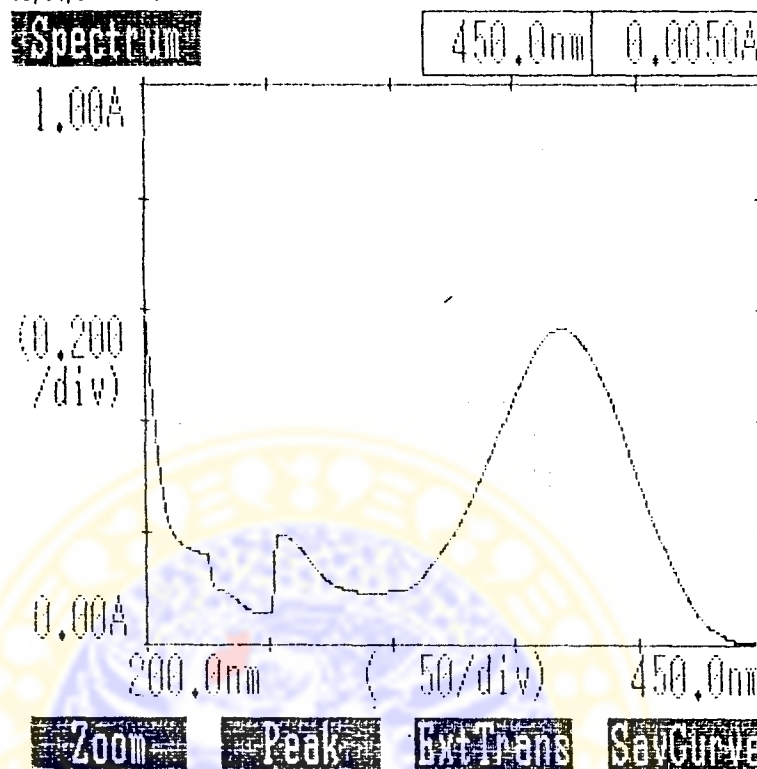
P : *pure* (murni)Pewarnaan *Acridine Orange* (AO)

1. AO 100 mg tambahkan antibiotika 1 mg dan air mineral 10 ml (dilakukan filtrasi terlebih dahulu) atau Tris-HCL 1 M (pH 7,2) 5 ml. Kocok dengan vortek 10 menit
2. Campuran keseluruhan ditambah air *ad* 5 ml (merupakan stok dengan kadar 100x sebanyak 10 ml)
3. Dilakukan pengenceran 10⁻¹ dalam air mineral terfiltrasi
4. Dilakukan pengenceran 10⁻¹ dalam 0,5 gliserin dan 8,5 air mineral
5. Solusio AO tersedia 10 ml

Lampiran 5

PANJANG GELOMBANG DIMINAZEN ASETURAT DALAM AIR

01/04/10 09:21:12



01/04/10 09:22:09

Peak detection

λ	ABS	λ	ABS
370.0	0.5647		
254.5	0.1986		

Valley

Lampiran 6.1

FORM CHECK LIST

Penampakan gejala toksisitas subakut dan akut diminazen aseturat						Test No.	Peneliti : Tanggal :														
Spesies Kambing PE	Sex : Jantan	Rute pemberian Intramuskular	Kadar bahan aktif :	Dosis : Bentuk Sediaan :	Sediaan farmasetik : No. batch :																
Waktu	Sub akut						Akut														
								Statis													
								Pulih													
Gejala klinik	<i>Defecation</i>	<i>Hyperaesthetic</i>	<i>Tremor</i>	<i>Itching</i>	<i>Urination</i>	<i>Geraham menutup</i>	<i>Tak penutup</i>	<i>Tachicardia</i>	<i>Hypersalivation</i>	<i>Oedematus alergica</i>	<i>Midriatic</i>	<i>Anaphylactic shock</i>	<i>Gejala lain</i>	<i>Anorexia nervosa</i>	<i>Clonis convulsion</i>	<i>Dispnoe</i>	<i>Regurgitasi</i>	<i>Recumbency</i>	Catatan	Sakit di daerah penyuntikkan	Gejala lain
Skor																					

Lampiran 6.2

PERHITUNGAN JUMLAH PARASIT YANG DIGUNAKAN

Subyek	Pengambilan cuplikan (yang digunakan)	Darah (10 ⁻¹)	(x/4).104.10 ^x Trip/ml darah	Hasil pasca pemisahan	
				PBG (ml)	Trip/ml PBG
Tikus 1	4,4 ml (1 ml)	ad 10 ml	32/4.10 ¹	9	5 .10 ⁵
Tikus 2	4,3 ml (1 ml)	ad 10 ml	24/4.10 ¹	9,5	3.10 ⁵
Tikus 3	4 ml (1 ml)	ad 10 ml	16.4.10 ¹	9,5	2.10 ⁵
Jumlah	12,7 ml (3 ml)	ad 30 ml	72/4.10 ¹	28	1.10 ⁶

Kebutuhan 6.10³ Trip/ml sehingga diperlukan pengenceran PBG 1000x dan hanya dibutuhkan tak lebih 1 ml dari pengenceran 1000x (disediakan lebh antara 3-5 ml)

Lampiran 7.1

249

UJI HIPOTESIS ANTARA PERLAKUAN DIM.ASET VS. SURAMIN

- - - t-tests for paired samples - - -

Variable	Number of pairs	Corr	2-tail Sig	Mean	SD	SE of Mean
DIM.ASET	10	.547	.102	1.4000	1.350	.427
SURAMIN				2.4000	1.265	.400

Paired Differences		SE of Mean	t-value	df	2-tail Sig
Mean	SD				
-1.0000	1.247	.394	-2.54	9	.032
95% CI (-1.892, -.108)					

Lampiran 7.2

UJI HIPOTESIS ANTARA PERLAKUAN DIM.ASET VS. KONTROL

Variable	Number of pairs	Corr	2-tail Sig	Mean	SD	SE of Mean
DIM.ASET	10			1.4000	1.350	.427
KONTROL				3.0000	.000	.000

Paired Differences		SE of Mean	t-value	df	2-tail Sig
Mean	SD				
-1.6000	1.350	.427	-3.75	9	.005
95% CI (-2.566, -.634)					

Lampiran 8

UJI HIPOTESIS ANTIGENITAS PERLAKUAN VS. KONTROL

250

Case Processing Summary

	Cases					
	Valid		Missing		Total	
	N	Percent	N	Percent	N	Percent
1=Sukses, 0= Tak sukses * 1= Perlakuan, 2= Plasebo	42	100.0%	0	.0%	42	100.0%

1=Parasitemia, 0= Nihil * 1= Perlakuan, 2= Kontrol Crosstabulation

Count

		1= Perlakuan, 2= Kontrol		Total
		1.00	2.00	
1=Parasitemia, .00		16	21	37
0= Nihil 1.00		5		5
Total		21	21	42

Chi-Square Tests

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)
Pearson Chi-Square	5.676 ^b	1	.017		
Continuity Correction ^a	3.632	1	.057		
Likelihood Ratio	7.609	1	.006		
Fisher's Exact Test				.048	.024
Linear-by-Linear Association	5.541	1	.019		
N of Valid Cases	42				

a. Computed only for a 2x2 table

b. 2 cells (50.0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 2.50.

Lampiran 9

PARAMETER KINETIK DOSIS TUNGGAL KAMBING SEHAT K-1 (Intramuskular)

N	T (menit)	Cp (µg/ml)	AUC	C'=M.e ^{-βt}	Cp-C'	C''=L.e ^{-αt}	(Cp-C')-C''	Ĉ	Ĉ-Cp	(Ĉ-Cp) ²
1	0	0	0	15,289	-15,289	30,06	-45,349	1,412	-1,412	1,994
2	5	16,058	40,145	15,273	-0,785	28,104	-27,319	14,789	-1,269	1,61
3	17	28,843	269,72	15,234	13,609	23,914	-10,305	28,947	0,104	0,0108
4	30	35,45	417,904	15,193	20,257			31,913	-3,537	12,51
5	51	31,664	704,694	15,126	16,538			23,679	-1,985	3,94
6	70	25,269	540,863	15,065	10,203			26,643	1,374	1,888
7	120	21,138	1160,175	14,908	6,23			20,856	-0,282	0,079
8	225	12,118	1745,94					16,025	3,907	15,265
9	630	10,687	4618,012					13,4004	2,713	7,362
10	2040	10,372	14846,6					9,961	-0,726	0,527
11	3447	8,184	13054,15					7,413	-0,771	0,594
12	4908	6,277	10563,76					5,454	-0,823	0,677
13	6336	4,98	8026,241					4,043	-0,937	0,878
14	7764	4,848	7027,02					2,994	-1,855	3,441
15	10660	0,924	8357,856					1,63	0,706	0,498
Total			71372,76							51,275

Pers : $\hat{C} = 15,289 \cdot e^{-0,00021 \cdot t} + 30,06 \cdot e^{-0,0134 \cdot t} - 43,937 \cdot e^{-0,086 \cdot t}$ (n=3), (Weighting factor/Wl = 1), Re = Wl.51,275, p=2n,

n1. r hit = 0,923 > r tab (0,05;6) = 0,707. p<0,05 K21 = (M.α + Lβ): (M+L) = 0,00469 menit⁻¹

M = 15,289 µg/ml

K13 = (αβ): K21 = 0,000604 menit⁻¹

β = 0,00021 menit⁻¹

K12 = α+β-K21-K13 = 0,00842 menit⁻¹

n2 r hit = 0,982 > r tab (0,05;2) = 0,970 p<0,05.

AIC = N .Ln Re+2p = 71,06

L = 30,06 µg/ml

T1/2 β = 0,693/β = 3300 menit⁻¹ = 55 jam⁻¹,

α = 0,0134 menit⁻¹

Tmaks = 31,05 menit, Cpmaks = 32,01 µg/ml

n3 r hit = 0,998 > r tab (0,05;1) = 0,997 p<0,05.

Vd(sentral) = (Fa.Dosis): (M+L) = 3082,692 ml

N = 43,937 µg/ml, Ka = 0,086 menit⁻¹

Cl = (Fa.Dosis) : AUC $0 \rightarrow \infty$ = 1,845 ml/menit

Diketahui : Berat badan 21 kg, Fa = 0,951 (Allu, Ødegaard, 1985)

AUC $0 \rightarrow \infty$ = 71372,76 + (0,924 : 0,00021) = 75772,76 µg/ml.menit

Lampiran 10

PARAMETER KINETIK DOSIS TUNGGAL KAMBING SEHAT K-2 (Intramuskular)

N	T (menit)	Cp (µg/ml)	AUC	C'=M.e ^{-βt}	Cp-C'	C''=L.e ^{-αt}	(Cp-C')-C''	Ĉ	Ĉ-Cp	(Ĉ-Cp) ²
1	0	0	0	18,715	-18,715	8,826	-27,541	-0,105	-0,105	0,011
2	6	15,767	47,30	18,699	-2,932	8,338	-11,27	15,685	0,098	0,0096
3	16	23,777	197,72	18,672	5,105	7,584	-2,48	23,788	0,011	0,0001
4	29	28,379	339,014	18,637	9,742			24,995	-3,384	11,451
5	53	22,337	608,592	18,574	3,764			23,904	1,567	2,455
6	72	22,17	422,816	18,523	3,647			22,982	0,812	0,659
7	125	21,607	1160,09	18,659	3,224			21,083	-0,524	0,274
8	229	17,762	2047,188					19,127	1,365	1,863
9	631	15,063	6597,825					17,155	2,092	4,376
10	2049	13,222	20054,065					14,048	-0,826	0,682
11	3456	12,829	18326,878					11,536	-1,293	1,672
12	4912	12,65	18548,712					9,409	-3,241	10,504
13	6336	6,663	13750,856					7,708	1,045	1,092
14	7769	5,893	8996,374					6,307	0,414	0,171
15	10666	3,859	14125,772					4,204	0,345	0,119
Total			105223,202							35,34

Pers : $\hat{C} = 18,715 \cdot e^{-0,00014 \cdot t} + 8,829 \cdot e^{-0,0095 \cdot t} - 27,649 \cdot e^{-0,151 \cdot t}$ (n=3), (Weighting factor/WI =1), Re = WI.35,34 p=2n,

n1. r hit = 0,962 > r tab (0,05;6) = 0,707. p<0,05 K21 = (M.α + Lβ): (M+L) = 0,0065 menit⁻¹

M = 18,715 µg/ml

K13 = (αβ): K21 = 0,0002 menit⁻¹

β = 0,00014 menit⁻¹

K12 = α+β-K21-K13 = 0,00294 menit⁻¹

n2 r hit = 0,757 < r tab (0,05;1) = 0,997 p<0,05. AIC = N .Ln Re+2p = 65,475

L = 8,829 µg/ml

T1/2 β = 0,693/β = 4950 menit⁻¹ = 82,5 jam⁻¹

α = 0,0095 menit⁻¹

Tmaks = 27,5 menit, Cpmax = 25,01 µg/ml

n3 r hit = 0,999 > r tab (0,05;1) = 0,997 p<0,05. Vd(sentral) = (Fa.Dosis): (M+L) = 4833,785 ml

N = 27,649 µg/ml, Ka = 0,151 menit⁻¹

Cl = (Fa.Dosis) : AUC $^{0 \rightarrow \infty}$ = 1,003 ml/menit

Diketahui : Berat badan 20 kg, Fa =0,951 (Allu, Ødegaard, 1985)

AUC $^{0 \rightarrow \infty}$ = 105223,202 + (3,859 : 0,00014) = 132787,488 µg/ml.menit

Lampiran 12

PARAMETER KINETIK DOSIS TUNGGAL KAMBING SEHAT K-4 (Intramuskular)

N	T (menit)	Cp (µg/ml)	AUC	C'=M.e ^{-βt}	Cp-C'	C''=L.e ^{-αt}	(Cp-C')-C''	Ĉ	Ĉ-Cp	(Ĉ-Cp) ²
1	0	0	0	14,811	-14,811	24,131	-38,942	-1,104	-1,104	1,219
2	5	17,824	44,56	14,795	3,028	22,771	-18,743	18,793	0,915	0,837
3	11	28,649	139,419	14,777	13,872	21,24	-7,37	28,4	-0,249	0,062
4	33	33,824	687,203	14,709	19,115			30,683	-3,141	9,866
5	58	26,392	752,7	14,632	11,759	α		26,657	0,263	0,0702
6	76	22,574	440,694	14,578	7,996			24,27	1,696	2,876
7	123	20,963	1023,119	14,435	6,528			19,948	-1,015	1,03
8	235	13,893	1951,936					15,536	1,643	2,699
9	567	11,4781	4211,586					13,175	1,697	2,88
10	2023	8	14179,984					9,685	1,685	2,839
11	3345	7,115	9991,015					7,337	0,222	0,049
12	4804	6,202	9714,751					5,401	-0,801	0,642
13	6244	5,205	6273,85					3,991	-1,214	1,474
14	7344	4,536	5357,55					3,168	-1,368	1,871
15	11625	0,904	11644,32					1,289	0,385	0,148
Total			66412,687							28,562

Pers : $\hat{C} = 14,811 \cdot e^{-0,00021 \cdot t} + 24,131 \cdot e^{-0,012 \cdot t} - 40,046 \cdot e^{-0,152 \cdot t}$ (n=3), (Weighting factor/Wi =1), Re = Wi.28,562 p=2n,

n1. r hit = 0,958 > r tab (0,05;6) = 0,707 p<0,05 K21 = (M.α + Lβ): (M+L) = 0,00454 menit⁻¹

M = 14,811 µg/ml

K13 = (αβ): K21 = 0,000537 menit⁻¹

β = 0,00021 menit⁻¹

K12 = α+β-K21-K13 = 0,00673 menit⁻¹

n2 r hit = 0,932 < r tab (0,05;1) = 0,997 p<0,05 AIC = N .Ln Re+2p = 62,281

L = 24,131 µg/ml

T1/2 β = 0,693/β = 3300 menit⁻¹ = 55 jam⁻¹,

α = 0,0116 menit⁻¹

Tmaks = 21,75 menit, Cpmaks = 32,01 µg/ml

n3 r hit = 0,999 > r tab (0,05;1) = 0,997. p<0,05

Vd(sentral) = (Fa.Dosis): (M+L) = 3760,824 ml

N = 40,046 µg/ml, Ka = 0,152 menit⁻¹

Cl = (Fa.Dosis) : AUC^{0→∞} = 2,07 ml/menit

Diketahui : Berat badan 22 kg, Fa =0,951 (Allu, Ødegaard, 1985)

AUC^{0→∞} = 66412,687 + (0,904: 0,00021) = 70717,449 µg/ml.menit

Lampiran 13

PARAMETER KINETIK DOSIS TUNGGAL KAMBING SEHAT K-5 (Intramuskular)

N	T (menit)	Cp (µg/ml)	AUC	C'=M.e ^{-βt}	Cp-C'	C''=L.e ^{-αt}	(Cp-C')-C''	\hat{C}	$\hat{C}-C_p$	($\hat{C}-C_p$) ²
1	0	0	0	20,021	-20,021	16,891	-36,912	2,792	2,792	7,795
2	6	17,124	51,372	19,997	-2,873	15,914	-18,787	14,607	-2,517	6,335
3	16	24,176	206,5	19,956	4,22	14,409	-10,189	24,65	0,474	0,225
4	33	36,288	513,944	19,888	16,4			29,502	-6,786	46,05
5	62	26,694	913,239	19,772	6,922			28,638	1,944	3,779
6	71	26,620	239,913	19,736	6,884			27,955	1,335	1,782
7	123	25,431	1353,326	19,53	5,901			32,974	7,543	56,897
8	235	16,264	2334,92					20,739	4,475	20,026
9	566	15,536	5262,9					17,939	2,682	7,193
10	2014	12,257	20122,132					13,383	1,126	1,268
11	3346	11,298	15687,63					10,253	-1,045	1,092
12	4805	9,087	14870,857					7,658	-1,429	2,042
13	6245	6,791	11432,16					5,742	-1,049	1,1004
14	7350	5,874	6997,412					4,603	-1,271	1,615
15	11623	1,36	15455,441					1,959	0,599	0,359
Total			95441,746							157,558

Pers : $\hat{C} = 16,891 \cdot e^{-0,00993 \cdot t} + 20,021 \cdot e^{-0,0002 \cdot t} - 34,12 \cdot e^{-0,0785 \cdot t}$ (n=3), (Weighting factor/Wi = 1), Re = Wi.157,558 p=2n,

n1. r hit = 0,965 > r tab (0,05;6) = 0,707 p<0,05

M = 20,021 µg/ml

β = 0,0002 menit⁻¹

n2 r hit = 0,802 < r tab (0,05;1) = 0,997 p<0,05

L = 16,891 µg/ml

α = 0,0099 menit⁻¹

n3 r hit = 0,985 < r tab (0,05;1) = 0,997 p<0,05

N = 34,12 µg/ml, Ka = 0,078 menit⁻¹

Diketahui : Berat badan 27,5 kg, Fa = 0,951 (Allu, Ødegaard, 1985)

AUC^{0→∞} = 95441,746 + (1,36:0,0002) = 102241,746 µg/ml.menit

K21 = (M.α + Lβ): (M+L) = 0,00546 menit⁻¹

K13 = (αβ): K21 = 0,000363 menit⁻¹

K12 = α+β-K21-K13 = 0,0043 menit⁻¹

AIC = N .Ln Re+2p = 87,9

T1/2 β = 0,693/β = 3465 menit⁻¹ = 57,75 jam⁻¹,

Tmaks = 37,509 menit, Cpmaks = 31,866 µg/ml

Vd(sentral) = (Fa.Dosis): (M+L) = 4959,57 ml

Cl = (Fa.Dosis) : AUC^{0→∞} = 1,79 ml/menit

Lampiran 14

PARAMETER KINETIK DOSIS TUNGGAL KAMBING TERTULAR K-6 (Intramuskular)

N	T (menit)	Cp (µg/ml)	AUC	C' ^t =M.e ^{-βt}	Cp-C'	C''=L.e ^{-αt}	(Cp-C')-C''	Ĉ	Ĉ-Cp	(Ĉ-Cp) ²
1	0	0	0	0,865	-0,865	84,131	-84,996	-41,356	-41,356	1710,319
2	25	0,754	9,425	0,864	-0,11	41,75	-41,86	7,511	6,757	45,657
3	40	2,276	22,725	0,863	1,413	27,421	-26,421	12,014	9,738	94,829
4	90	6,648	223,1	0,859	5,789	6,753	-0,964	6,368	-0,28	0,078
5	140	2,521	229,225	0,855	1,666			2,427	-0,094	0,009
6	160	1,8	43,21	0,854	0,946			1,772	-0,028	0,0008
7	180	1,396	31,9	0,853	0,543			1,385	-0,011	0,0001
8	240	1,148	76,32					0,949	-0,199	0,0396
9	705	0,925	481,972					0,816	-0,109	0,012
10	1445	0,608	567,21					0,767	0,159	0,025
11	2895	0,596	872,9					0,68	0,084	0,007
12	4350	0,537	824,257					0,602	0,065	0,0004
13	5767	0,483	722,67					0,535	0,052	0,0027
14	7215	0,458	681,284					0,474	0,016	0,0003
15	10105	0,449	1310,615					0,373	-0,076	0,006
Total			6096,873							1850,99

Pers : $\hat{C} = 84,131.e^{-0,028.t} + 0,866.e^{-0,00008.t} - 126,353.e^{-0,051.t}$ (n=3), (Weighting factor/Wi =1), Re = Wi.1850,99 p=2n,
 n1. r hit = 0,842 > r tab (0,05;6) = 0,707 p<0,05 K21 = (M.α + Lβ): (M+L) = 0,0004 menit⁻¹
 M = 0,866 µg/ml K13 = (αβ): K21 = 0,006 menit⁻¹
 β = 0,0000834 menit⁻¹ K12 = α+β-K21-K13 = 0,021 menit⁻¹
 n2 r hit = 0,999 > r tab (0,05;1) = 0,997 p<0,05 AIC = N .Ln Re+2p = 124,5
 L = 84,131 µg/ml T1/2 β = 0,693/β = 8309,352 menit⁻¹ = 138,489 jam⁻¹
 α = 0,028 menit⁻¹ Tmaks = 43,327 menit, Cpmaks = 12,183 µg/ml
 n3 r hit = 0,978 > r tab (0,05;2) = 0,950. p<0,05 Vd(sentral) = (Fa.Dosis): (M+L) = 2271,319 ml
 N = 126,353 µg/ml, Ka = 0,051 menit⁻¹ Cl = (Fa.Dosis): AUC 0→∞ = 16,816ml/menit
 Diketahui : Berat badan 29 kg, Fa =0,951 (Allu, Ødegaard, 1985)
 AUC0→∞ = 6096,873 + (0,449:0,00008) = 11480,566 µg/ml.menit

Lampiran 15

PARAMETER KINETIK DOSIS TUNGGAL KAMBING TERTULAR K-7 (Intramuskular)

N	T (menit)	Cp (µg/ml)	AUC	C'=M.e ^{-βt}	Cp-C'	C''=L.e ^{-αt}	(Cp-C')-C''	Ĉ	Ĉ-Cp	(Ĉ-Cp) ²
1	0	0	0	2,064	-2,064	17,185	-19,249	5,294	5,295	28,03
2	25	1,244	15,55	2,055	-0,811	15,228	-16,039	4,145	2,901	8,416
3	37	4,928	37,032	2,051	2,876	14,369	-11,509	6,687	1,759	3,094
4	90	10,871	418,673	2,034	8,836	11,120	-2,284	10,564	-0,307	0,0942
5	142	10,702	560,898	2,017	8,684			9,955	-0,747	0,558
6	160	9,875	185,193	2,012	7,863			9,484	-0,391	0,153
7	180	9,229	191,04	2,005	7,223			8,923	-0,306	0,0094
8	240	3,425	379,62					7,304	3,879	15,047
9	710	2,181	1317,41					2,395	0,214	0,046
10	1445	1,307	1281,84					1,653	0,346	0,12
11	2901	0,843	1565,2					1,297	0,45	0,203
12	4375	0,797	1208,68					1,025	0,228	0,052
13	5773	0,779	1101,624					0,819	0,04	0,0016
14	7205	0,608	993,062					0,652	0,044	0,0194
15	10105	0,568	1705,2					0,41	-0,158	0,025
Total			10961,052							55,951

Pers : $\hat{C} = 17,185 \cdot e^{-0,048t} + 2,064 \cdot e^{-0,0002t} - 24,543 \cdot e^{-0,025t}$ (n=3), (Weighting factor/Wi=1), Re = Wi.55,951 p=2n,

n1. r hit = 0,863 > r tab (0,05;6) = 0,707 p<0,05

M = 2,063 µg/ml

β = 0,0002 menit⁻¹

n2. r hit = 0,997 > r tab (0,05;1) = 0,997 p<0,05

L = 17,185 µg/ml

α = 0,005 menit⁻¹

n3. r hit = 0,975 > r tab (0,05;2) = 0,950 p<0,05

N = 24,543 µg/ml, Ka = 0,025 menit⁻¹

Diketahui : Berat badan 29 kg, Fa = 0,951 (Aliu, Ødegaard, 1985)

AUC^{0→∞} = 10961,052 + (0,568:0,0002) = 14511,052 µg/ml.menit

K21 = (M.α + Lβ): (M+L) = 0,0007 menit⁻¹

K13 = (αβ): K21 = 0,0012 menit⁻¹

K12 = α+β-K21-K13 = 0,0032 menit⁻¹

AIC = N .Ln Re+2p = 72,37

T1/2 β = 0,693/β = 4331,25 menit⁻¹ = 72,19 jam⁻¹

Tmaks = 99,7 menit, Cpmaks = 10,608 µg/ml

Vd(sentral) = (Fa.Dosis): (M+L) = 10029,405 ml

Cl = (Fa.Dosis) : AUC^{0→∞} = 13,304 ml/menit

Lampiran 16

PARAMETER KINETIK DOSIS TUNGGAL KAMBING TERTULAR K-8 (Intramuskular)

N	T (menit)	Cp (µg/ml)	AUC	C'=M.e ^{-kt}	Cp-C'	C''=L.e ^{-αt}	(Cp-C')-C''	Ĉ	Ĉ-Cp	(Ĉ-Cp) ²
1	0	0	0	1,506	-1,506	40,013	-41,519	-3,1944	-3,1944	10,204
2	15	1,331	9,9825	1,502	-0,171	32,3	-32,471	2,781	1,45	2,103
3	38	2,469	43,7	1,496	0,973	23,261	-22,288	6,771	4,302	18,507
4	63	7,889	129,475	1,489	6,4	16,28	-9,88	7,884	0,005	0,00003
5	151	6,027	612,304	1,464	4,562			4,959	-1,068	1,141
6	160	5,615	52,389	1,462	4,153			4,62	-0,995	0,99
7	218	3,223	256,302	1,446	1,777			2,998	-0,225	0,051
8	248	1,496	70,785					2,486	0,99	0,98
9	720	1,258	649,944					1,318	0,06	0,004
10	1445	1,175	881,962					1,15	-0,025	0,001
11	2903	1,013	1595,052					0,876	-0,137	0,019
12	4378	0,542	1146,82					0,666	0,124	0,015
13	5776	0,54	756,318					0,513	-0,027	0,001
14	7218	0,362	650,342					0,392	0,03	0,001
15	10110	0,246	879,168					0,2285	-0,017	0,0003
Total			7734,535							34,016

Pers : $\hat{C} = 40,013 \cdot e^{-0,0143 \cdot t} + 1,506 \cdot e^{-0,0002 \cdot t} - 44,713 \cdot e^{-0,0224 \cdot t}$ (n=3), (Weighting factor/Wi=1), Re = Wi.34,016 p=2n,

n1. r hit = 0,986 > r tab (0,05;6) = 0,707 p<0,05 K21 = (M.α + Lβ): (M+L) = 0,0007 menit⁻¹

M = 1,506 µg/ml

K13 = (αβ): K21 = 0,004 menit⁻¹

β = 0,0002 menit⁻¹

K12 = α+β-K21-K13 = 0,01 menit⁻¹

n2 r hit = 0,999 > r tab (0,05;1) = 0,997. p<0,05

AIC = N .Ln Re+2p = 64,902

L = 40,013 µg/ml

T1/2 β = 0,693/β = 3715,817 menit⁻¹ = 61,93 jam⁻¹

α = 0,0143 menit⁻¹

Tmaks = 68,914 menit, Cpmaks = 6,908 µg/ml

n3 r hit = 0,983 > r tab (0,05;2) = 0,950. p<0,05

Vd(sentral) = (Fa.Dosis): (M+L) = 4329,08 ml

N = 44,713 µg/ml, Ka = 0,0224 menit⁻¹

Cl = (Fa.Dosis) : AUC ^{0→∞} = 19,852 ml/menit

Diketahui: Berat badan 27 kg, Fa = 0,951 (Allu, Ødegaard, 1985)

AUC^{0→∞} = 7734,535 + (0,246:0,00002) = 9053,57 µg/ml.menit

Lampiran 17

PARAMETER KINETIK DOSIS TUNGGAL KAMBING TERTULAR K-9 (Intramuscular)

N	T (menit)	Cp (µg/ml)	AUC	C'=M.e ^{-kt}	Cp-C'	C''=L.e ^{-αt}	(Cp-C')-C''	Ĉ	Ĉ-Cp	(Ĉ-Cp) ²
1	0	0	0	1,297	-1,297	57,398	-58,695	-15,962	-15,962	254,785
2	11	10,876	59,818	1,296	9,58	47,436	-37,856	17,05	6,174	38,116
3	37	24,738	462,982	1,293	23,445	30,251	-6,806	27,365	2,627	6,901
4	47	25,112	249,25	1,292	23,82	25,445	-1,252	24,82	-0,292	0,0853
5	70	21,216	532,772	1,289	19,927	α		18,062	-3,154	9,948
6	80	11,266	162,241	1,288	9,978			15,518	4,252	18,079
7	120	10,683	438,98	1,283	9,4			8,473	-2,21	4,884
8	245	2,051	795,875					2,095	0,044	0,00194
9	725	1,745	911,04					1,211	-0,534	0,285
10	1425	1,026	969,85					1,2061	0,1801	0,0324
11	2875	0,787	644,96					0,987	0,2	0,04
12	4320	0,748	1109,037					0,86	0,112	0,0125
13	5760	0,729	1063,44					0,75	0,021	0,000441
14	7207	0,651	998,43					0,653	0,002	0,0004
15	10088	0,565	1751,648					0,4469	-0,0681	0,00464
Total			10150,323							333,176

Pers : $\hat{C} = 1,297 \cdot e^{-0,000095 \cdot t} + 57,38 \cdot e^{-0,0173 \cdot t} - 74,639 \cdot e^{-0,0779 \cdot t}$ (n=3), (Weighting factor/WI = 1), Re = WI.333,176 p=2n,

n1. r hit = 0,850 > r tab (0,05;6) = 0,707 p<0,05 K21 = (M.α + Lβ): (M+L) = 0,0005 menit⁻¹

M = 1,297 µg/ml

K13 = (αβ): K21 = 0,0035 menit

β = 0,000095 menit⁻¹

K12 = α+β-K21-K13 = 0,0135 menit⁻¹

n2 r hit = 0,981 > r tab (0,05;1) = 0,997 p<0,05 AIC = N .Ln Re+2p = 99,13

L = 57,38 µg/ml

T1/2 β = 0,693/β = 7287,066 menit⁻¹ = 121.451 jam⁻¹

α = 0,0173 menit⁻¹

Tmaks = 29,733 menit, Cpmaks = 27,544 µg/ml

n3 r hit = 0,972 > r tab (0,05;2) = 0,950 p<0,05 Vd(sentral) = (Fa.Dosis): (M+L) = 2609.396 ml

N = 74,639 µg/ml, Ka = 0,0779 menit⁻¹

Cl = (Fa.Dosis) : AUC ^{0→∞} = 9,515 ml/menit

Diketahui: Berat badan 23 kg, Fa = 0,951 (Allu, Ødegaard, 1985)

AUC^{0→∞} = 10150.323 + (0,565:0,000095) = 16091,438 µg/ml.menit

Lampiran 18

PARAMETER KINETIK DOSIS TUNGGAL KAMBING TERTULAR K-10 (Intramuskular)

N	T (menit)	Cp (µg/ml)	AUC	C'=M.e ^{-βt}	Cp-C'	C''=L.e ^{-αt}	(Cp-C')-C''	Ĉ	Ĉ-Cp	(Ĉ-Cp) ²
1	0	0	0	1,65	-1,65	25,986	-27,636	-5,375	-5,375	28,891
2	10	5,768	28,84	1,647	4,12	19,941	-15,821	Ka 5,707	-0,061	0,0037
3	30	7,604	133,72	1,643	5,961	11,74	-5,778	9,707	2,103	4,423
4	50	7,9	86,604	1,638	6,262	6,911	-0,649	7,698	-0,202	0,041
5	75	6,215	176,437	1,632	4,583			5,059	-1,156	1,336
6	92	3,167	79,747	1,628	1,539			3,86	0,693	0,48
7	123	2,768	91,992	1,621	1,147			2,615	-0,153	0,0234
8	240	2,294	216,127					1,638	-0,656	0,43
9	720	1,627	941,04					1,487	-0,14	0,0196
10	1430	1,021	940,04					1,342	0,321	0,103
11	2875	0,991	1453,67					1,09	0,099	0,0098
12	4320	0,77	1272,322					0,885	0,115	0,013
13	5752	0,692	1046,792					0,72	0,028	0,001
14	7205	0,522	891,971					0,584	0,062	0,00384
15	10095	0,438	1452,225					0,385	-0,098	0,0096
Total			8881,5275							35,788

Pers : $\hat{C} = 1,649.e^{-0,000144.t} + 25,99.e^{-0,0265.t} - 33,014.e^{-0,07318.t}$ (n=3), (Weighting factor/Wi = 1), Re = Wi.35,788 p=2n,

n1. r hit = 0,920 > r tab (0,05;6) = 0,707 p<0,05 K21 = (M.α + Lβ): (M+L) = 0,00172 menit⁻¹

M = 1,6498 µg/ml

K13 = (αβ): K21 = 0,00221 menit⁻¹

β = 0,0001435 menit⁻¹

K12 = α+β-K21-K13 = 0,0227 menit⁻¹

n2 r hit = 0,8834 < r tab (0,05;1) = 0,997 p<0,05 AIC = N .Ln Re+2p = 65,664

L = 2599 µg/ml

T1/2 β = 0,693/β = 4829,268 menit⁻¹ = 80,488 jam⁻¹

α = 0,0265 menit⁻¹

Tmaks = 26,875 menit, Cpmaks = 9,776 µg/ml

n3 r hit = 0,988 > r tab (0,05;2) = 0,950. p<0,05 Vd(sentral) = (Fa.Dosis): (M+L) = 5298,625 ml

N = 33,014 µg/ml, Ka = 0,0732 menit⁻¹

Cl = (Fa.Dosis) : AUC ^{0→∞} = 11,958 ml/menit

Diketahui : Berat badan 22 kg, Fa = 0,951 (Aliu, Ødegaard, 1985)

AUC^{0→∞} = 8881,5275 + (0,483:0,00014) = 12247,381 µg/ml.menit

Lampiran 19

261

KADAR ESTIMASI SATU KALI PEMBERIAN SUBYEK K-6 HINGGA K-10

T (menit)	\hat{C} K-6 (ug/ml)	\hat{C} K-7 (ug/ml)	\hat{C} K-8 (ug/ml)	\hat{C} K-9 (ug/ml)	\hat{C} K-10 (ug/ml)	Min (ug/ml)	Rerata (ug/ml)	Max (ug/ml)
0	-	-	-	-	-	-	-	-
17.5	0.828	2.00	2.442	24.591	8.82	0.828	7.736	24.591
20	3.54	2.77	2.993	26.176	9.306	2.77	8.957	26.176
25	7.511	4.145	3.944	27.881	9.747	3.944	10.645	27.881
30	9.987	5.323	4.718	28.23	9.707	4.718	11.593	28.23
35	11.384	6.328	5.338	27.726	9.376	5.338	11.812	27.726
40	12.014	7.182	5.826	26.706	8.88	5.826	12.122	26.703
45	12.109	7.903	6.2	25.393	8.303	6.2	11.982	25.393
50	11.841	8.507	6.477	23.932	7.698	6.477	11.691	23.932
55	11.336	9.009	6.671	22.42	7.101	6.671	11.307	22.42
60	10.687	9.421	6.794	20.915	6.529	6.529	10.869	20.915
70	9.159	10.022	6.871	18.062	5.505	5.505	9.929	18.062
90	6.368	10.564	6.573	13.312	3.978	3.978	8.159	13.312
140	2.427	10.004	4.928	6.371	2.252	2.252	5.196	10.004
160	1.772	9.484	4.620	4.88	1.986	1.772	4.548	9.484
180	1.385	8.923	3.713	3.824	1.827	1.385	3.934	8.923
240	0.949	7.304	2.526	2.17	1.638	0.949	2.926	7.304
720	0.815	2.366	1.318	1.211	1.487	0.815	1.439	2.366
1440	0.767	1.655	1.151	1.131	1.34	0.767	1.209	1.655
2880	0.681	1.302	0.88	0.986	1.089	0.681	0.988	1.302
4320	0.604	1.034	0.673	0.86	0.885	0.604	0.811	1.034
5760	0.535	0.821	0.514	0.75	0.719	0.514	0.668	0.821
7200	0.475	0.652	0.393	0.654	0.585	0.393	0.552	0.654
10080	0.373	0.411	0.23	0.497	0.386	0.23	0.379	0.497

$$C_p \text{ K-6} = 84,131.e^{-0,028.t} + 0,8655.e^{-0,0000834.t} - 126.351.e^{-0,051.t}$$

$$C_p \text{ K-7} = 17.185.e^{-0,00484.t} + 2,0637.e^{-0,00016.t} - 24.543.e^{-0,025.t}$$

$$C_p \text{ K-8} = 40.0126.e^{-0,0143.t} + 1.506.e^{-0,0001865.t} - 44.713.e^{-0,0224.t}$$

$$C_p \text{ K-9} = 57.38.e^{-0,0173.t} + 1.297.e^{-0,0000951.t} - 74.639.e^{-0,0779.t}$$

$$C_p \text{ K-10} = 1.649.e^{-0,000144.t} + 25.99.e^{-0,02649.t} - 33.0137.e^{-0,07318.t}$$

Lampiran 20

262

KADAR ESTIMASI SATU KALI PEMBERIAN SUBYEK K-1 HINGGA K-5

T (menit)	Ĉ K-1 (ug/ml)	Ĉ K-2 (ug/ml)	Ĉ K-3 (ug/ml)	Ĉ K-4 (ug/ml)	Ĉ K-5 (ug/ml)	Min (ug/ml)	Rerata (ug/ml)	Max (ug/ml)
0	-	-	-	-	-	-	-	-
5	14.789	14.126	15.718	18.793	13.03	13.03	15.291	18.793
10	22.928	20.609	25.597	27.424	19.712	19.712	23.254	27.424
17.5	29.213	24.177	25.368	31.516	25.51	24.177	27.157	31.516
20	30.304	24.614	25.593	31.815	26.691	24.614	27.803	31.815
25	31.54	24.978	25.559	31.714	28.305	24.978	28.485	31.714
30	31.914	24.978	25.205	31.135	29.197	24.978	28.486	31.914
35	31.754	24.815	24.725	30.362	29.627	24.725	28.371	31.752
40	31.27	24.582	24.206	29.527	29.739	24.206	27.865	31.27
45	30.603	24.324	23.683	28.691	29.648	23.683	27.39	30.603
50	29.838	24.06	23.173	27.88	29.429	23.173	26.876	29.838
55	29.032	23.8	22.681	27.104	29.145	22.681	26.352	29.145
60	28.219	23.548	22.21	26.367	28.784	22.21	25.825	28.784
70	26.643	23.072	21.331	25.011	28.031	21.331	24.818	28.031
90	24.160	22.235	19.803	22.728	26.545	19.803	23.094	26.545
140	19.387	20.687	17.039	18.88	23.674	17.039	19.933	23.674
160	18.250	20.231	16.249	18.346	22.218	16.249	19.059	22.218
180	17.368	19.846	15.593	17.044	22.14	15.593	18.398	22.14
240	15.715	19	14.211	15.438	20.641	14.211	17.001	20.641
720	13.145	16.93	11.801	12.737	17.349	11.801	14.392	17.349
1440	11.299	15.298	10.656	10.946	15.011	10.656	12.642	15.298
2880	8.351	12.505	8.710	8.089	11.255	8.089	9.782	12.505
4320	6.171	10.222	7.12	5.979	8.438	5.979	7.586	10.222
5760	4.561	8.355	5.82	4.418	6.327	4.418	5.896	8.355
7200	3.371	6.83	4.757	3.265	4.742	3.371	4.593	6.83
10080	1.841	4.564	3.179	1.783	2.666	1.783	2.807	4.564

$$\begin{aligned}
 C_p \text{ K-1} &= 30.06.e^{-0,0135.t} + 15,289.e^{-0,00021.t} - 43,937.e^{-0,086.t} \\
 C_p \text{ K-2} &= 18.715.e^{-0,00014.t} + 8,829.e^{-0,0095.t} - 27,649.e^{-0,151.t} \\
 C_p \text{ K-3} &= 16,667.e^{-0,00975.t} + 13,0358.e^{-0,00014.t} - 29,992.e^{-0,1644.t} \\
 C_p \text{ K-4} &= 14,811.e^{-0,00021.t} + 24,131.e^{-0,012.t} - 40,046.e^{-0,152.t} \\
 C_p \text{ K-5} &= 16.891e^{-0,00993.t} + 20.021.e^{-0,0002.t} - 34.12.e^{-0,0785.t}
 \end{aligned}$$

Lampiran 21.1UJI PERBEDAAN PARAMETER μ ANTAR KELOMPOK

t-tests for independent samples of KINETIK 1=K6-K10,2=K1-K5

Variable	Number of Cases	Mean	SD	SE of Mean
KA 1=K6-K10,2=K1-K5				
KINETIK 1	5	.0498	.026	.012
KINETIK 2	5	.1262	.041	.018

Mean Difference = -.0764

Levene's Test for Equality of Variances: F= 4.524 P= .066

t-test for Equality of Means					95%
Variances	t-value	df	2-Tail Sig	SE of Diff	CI for Diff
Equal	-3.53	8	.008	.022	(-.126, -.026)
Unequal	-3.53	6.81	.010	.022	(-.128, -.025)

Lampiran 21.2

UJI PERBEDAAN PARAMETER ALFA ANTAR KELOMPOK

-t-test for independent samples of KINETIK 1=K6-K10, 2=K1-K5

Variable	Number of Cases	Mean	SD	SE of Mean
ALFA 1=K6-K10,2=K1-K5				
KINETIK 1	5	.0180	.009	.004
KINETIK 2	5	.0104	.002	.001

Mean Difference = .0076

Levene's Test for Equality of Variances: F= 8.023 P= .022

t-test for Equality of Means					95%
Variances	t-value	df	2-Tail Sig	SE of Diff	CI for Diff
Equal	1.79	8	.111	.004	(-.002, .017)
Unequal	1.79	4.21	.144	.004	(-.004, .019)

Lampiran 21.3

UJI PERBEDAAN TMAKS ANTAR KELOMPOK

-t-tests for independent samples of KINETIK 1=K6-K10,2=K1-K5

Variable	Number of Cases	Mean	SD	SE of Mean
TMAKS 1=K6-K10,2=K1-K5				
KINETIK 1	5	53.7080	30.616	13.692
KINETIK 2	5	27.9560	6.622	2.961

Mean Difference = 25.7520

Levene's Test for Equality of Variances: F= 9.416 P= .015

t-test for Equality of Means					95%
Variances	t-value	df	2-Tail Sig	SE of Diff	CI for Diff
Equal	1.84	8	.103	14.008	(-6.560, 58.064)
Unequal	1.84	4.37	.134	14.008	(-13.155, 64.659)

Lampiran 21.4

UJI PERBEDAAN PARAMETER CMAKS ANTAR KELOMPOK

-t-tests for independent samples of KINETIK 1=K6-K10,2=K1-K5

Variable	Number of Cases	Mean	SD	SE of Mean
CMAKS 1=K6-K10,2=K1-K5				
KINETIK 1	5	13.4038	8.133	3.637
KINETIK 2	5	29.3820	3.553	1.589

Mean Difference = -15.9782

Levene's Test for Equality of Variances: F= 1.222 P= .301

t-test for Equality of Means					95%
Variances	t-value	df	2-Tail Sig	SE of Diff	CI for Diff
Equal	-4.03	8	.004	3.969	(-25.134, -6.823)
Unequal	-4.03	5.47	.008	3.969	(-26.185, -5.772)

Lampiran 21.5

UJI PERBEDAAN PARAMETER VOLUME DISTRIBUSI ANTAR KELOMPOK

t-tests for independent samples of KINETIK 1=K6-K10,2=K1-K5

Variable	Number of Cases	Mean	SD	SE of Mean
VD 1=K6-K10,2=K1-K5				
KINETIK 1	5	4.9080	3.121	1.396
KINETIK 2	5	4.2820	.806	.360

Mean Difference = .6260

Levene's Test for Equality of Variances: F= 3.159 P= .113

t-test for Equality of Means					95%
Variances	t-value	df	2-Tail Sig	SE of Diff	CI for Diff
Equal	.43	8	.676	1.441	(-2.699, 3.951)
Unequal	.43	4.53	.684	1.441	(-3.081, 4.333)

Lampiran 21.6

UJI PERBEDAAN PARAMETER WAKTU PARUH ELIMINASI ANTAR KELOMPOK

-tests for independent samples of KINETIK 1=K6-K10,2=K1-K5

Variable	Number of Cases	Mean	SD	SE of Mean
W.PARUH 1=K6-K10,2=K1-K5				
KINETIK 1	5	94.9140	33.226	14.859
KINETIK 2	5	72.0500	14.342	6.414

Mean Difference = 22.8640

Levene's Test for Equality of Variances: F= 9.271 P= .016

t-test for Equality of Means					95%
Variances	t-value	df	2-Tail Sig	SE of Diff	CI for Diff
Equal	1.41	8	.195	16.185	(-14.468, 60.196)
Unequal	1.41	5.44	.212	16.185	(-18.753, 64.481)

Lampiran 21.7

UJI PERBEDAAN PARAMETER KLIRENS ANTAR KELOMPOK

t-tests for independent samples of KINETIK 1=K6-K10,2=K1-K5

Variable	Number of Cases	Mean	SD	SE of Mean
KLIRENS 1=K6-K10,2=K1-K5				
KINETIK 1	5	14.2894	4.078	1.824
KINETIK 2	5	1.6456	.411	.184

Mean Difference = 12.6438

Levene's Test for Equality of Variances: F= 11.910 P= .009

Variances	t-test for Equality of Means			SE of Diff	95% CI for Diff
	t-value	df	2-Tail Sig		
Equal	6.90	8	.000	1.833	(8.416, 16.872)
Unequal	6.90	4.08	.002	1.833	(7.553, 17.735)

Lampiran 21.8

UJI PERBEDAAN PARAMETER AUC ANTAR KELOMPOK

-tests for independent samples of KINETIK 1=K6-K10,2=K1-K5

Variable	Number of Cases	Mean	SD	SE of Mean
AUC 1=K6-K10,2=K1-K5				
KINETIK 1	5	12676.8220	2727.965	1219.983
KINETIK 2	5	94817.7900	24725.531	11057.594

Mean Difference = -82140.9680

Levene's Test for Equality of Variances: F= 6.409 P= .035

Variances	t-test for Equality of Means			SE of Diff	95% CI for Diff
	t-value	df	2-Tail Sig		
Equal	-7.38	8	.000	11124.690	(-107802, -56480.2)
Unequal	-7.38	4.10	.002	11124.690	(-113039, -51242.9)

Lampiran 22**PENENTUAN MODA BERDASARKAN WAKTU PARUH ELIMINASI SELURUH SUBYEK PADA STUDI KINETIK SATU KALI PEMBERIAN**

Rentang klas $138,5 \text{ jam}^{-1} - 55 \text{ jam}^{-1} = 83,5 \text{ jam}^{-1}$

Minimum banyak klas = $1 + (3,3) \log 10 = 5,3$ (dibuat 5-6 klas)

Interval klas = $83,5 : 5,3 = 15,75 \text{ jam}^{-1}$ Dibulatkan 16 jam^{-1}

A) $b = 72, b_1 = 5 - 1 = 4, b_2 = 5 - 3 = 2$

$M_o = b + \text{interval klas} \{b_1 : (b_1 + b_2)\} = 72 + 16 \{4 : (4 + 2)\} = 82,67 \text{ jam}^{-1}$

Modal I ditemukan di daerah $72 \text{ jam}^{-1} - 88 \text{ jam}^{-1}$ (klas 2)

B) $b = 123, b_1 = 1 - 0 = 1, b_2 = 1 - 0 = 1$

$M_o = b + \text{interval klas} \{b_1 : (b_1 + b_2)\} = 123 + 16 \{1 : (1 + 1)\} = 131 \text{ jam}^{-1}$

Modal II ditemukan di daerah $123 \text{ jam}^{-1} - 139 \text{ jam}^{-1}$ (klas 5)

Catatan : Harga 0 pada $b_1 = 1 - 0$, berasal dari anggapan klas ke 6 tak ada

Klas NO.	$T_{1/2\beta}$ (jam^{-1})	f_i	Nilai tengah (jam^{-1})
1	55 - 71	3	63
2	72 - 88	5	80
3	89 - 105	1	97
4	106 - 122	0	114
5	123 - 139	1	131

Lampiran 23**DAFTAR NILAI PROBIT
BERHUBUNGAN DENGAN RESPON TRIPANOSIDAL (%)**

%	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
0	-	2.67	2.95	3.12	3.25	3.36	3.45	3.52	3.59	3.69
10	3.72	3.77	3.82	3.87	3.92	3.96	4.01	4.05	4.08	4.12
20	4.16	4.19	4.23	4.26	4.29	4.33	4.36	4.39	4.42	4.45
30	4.48	4.50	4.53	4.56	4.59	4.61	4.64	4.67	4.69	4.72
40	4.75	4.77	4.80	4.82	4.85	4.87	4.90	4.92	4.95	4.97
50	5.00	5.03	5.05	5.08	5.10	5.13	5.15	5.18	5.20	5.23
60	5.25	5.28	5.31	5.33	5.36	5.39	5.41	5.44	5.47	5.50
70	5.52	5.55	5.58	5.61	5.64	5.67	5.71	5.74	5.77	5.81
80	5.84	5.88	5.92	5.95	5.99	6.04	6.08	6.13	6.18	6.23
90	6.28	6.34	6.41	6.48	6.55	6.64	6.75	6.88	7.05	7.33
	0.0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9
99	7.33	7.37	7.41	7.46	7.51	7.58	7.65	7.75	7.88	8.09

Lampiran 24

PENENTUAN BATAS KADAR TERAPI MINIMUM DAN INTERVAL PEMBERIAN BERULANG

Diketahui :

(Tabel 5.15)	:	5,22 mg/kg	(Tabel 5.12)	:	
Dosis terapi efektif minimum (D)	:	berat badan	Rerata kinetik penderita tertular	:	
(Tabel 5.12)	:		Rerata kinetik penderita tertular	:	
Berat badan	:	26 kg	Tetapan α	:	0,018 menit ⁻¹
Fraksi obat terabsorpsi (F)	:	0,951 %	Tetapan β	:	0,00013
Tetapan Laju absorpsi (Ka)	:	0,05 menit ⁻¹	Laju perifer \rightarrow sentral (K ₂₁)	:	0,001
Volume distribusi (Vd)	:	4,91 L	Tmaks	:	53,71 menit

$$C_p = \frac{D \cdot F \cdot K_a}{V_d} \cdot \left\{ \left[\frac{K_{21} - \alpha}{(K_a - \alpha) \cdot (\beta - \alpha)} \right] \cdot e^{-\alpha \cdot t} + \left[\frac{K_{21} - \beta}{(K_a - \beta) \cdot (\alpha - \beta)} \right] \cdot e^{-\beta \cdot t} + \left[\frac{K_{21} - K_a}{(\alpha - K_a) \cdot (\beta - K_a)} \right] \cdot e^{-K_a \cdot t} \right\}$$

$$\tau = \frac{1}{\beta} \cdot \ln \left(1 + \frac{D \cdot F}{\Lambda_c \cdot bb \cdot MTC} \right) = \frac{1}{0,00013} \cdot \ln \left(1 + \frac{271,44 \cdot 0,951}{188,846 \cdot 26 \cdot 13,29} \right) = 31,243$$

$$\Lambda_c = \frac{V_d}{Bb} = \frac{4910}{26} = 188,846$$

$$C_p = \frac{135,72 \cdot 0,951 \cdot 0,05}{4,91} \cdot \left\{ \left[\frac{0,01 - 0,018}{(0,05 - 0,018) \cdot (0,00013 - 0,018)} \right] \cdot e^{-0,018 \cdot 53,71} + \left[\frac{0,001 - 0,00013}{(0,05 - 0,00013) \cdot (0,018 - 0,00013)} \right] \cdot e^{-0,00013 \cdot 53,71} + \left[\frac{0,001 - 0,05}{(0,018 - 0,05) \cdot (0,00013 - 0,05)} \right] \cdot e^{-0,05 \cdot 53,71} \right\}$$

$$C_p = 1,314 \cdot (11,306 + 0,9 - 2,094) = 13,287$$

**PERKIRAAN KADAR PEMBERIAN BERULANG
MENGUNAKAN METODE SUPERPOSISI**

$$C_{p1}(10,44mg) = \frac{27,44 \cdot 0,951 \cdot 0,05}{4,91} \cdot \left[\left[\frac{0,014 - 0,018}{(0,05 - 0,018)(0,00013 - 0,018)} \right] \cdot e^{-0,018,t} + \left[\frac{0,014 - 0,00013}{(0,05 - 0,00013)(0,018 - 0,00013)} \right] \cdot e^{-0,00013,t} + \left[\frac{0,014 - 0,05}{(0,018 - 0,05)(0,00013 - 0,05)} \right] \cdot e^{-0,05,t} \right]$$

$$C_{p1}(10,44mg) = 2,63 \cdot (6,99 \cdot e^{-0,018,t} + 15,563 \cdot e^{-0,00013,t} - 22,56 \cdot e^{-0,05,t})$$

$$C_{p2}(7mg) = 1,48 \cdot e^{-0,00013,t} + 44,94 \cdot e^{-0,018,t} - 60,652 \cdot e^{-0,05,t}$$

Lampiran 26

**KADAR ESTIMASI "SUPERIMPOSE"
DOSIS 10,44 DAN 7 MG/KG BB SATU KALI PEMBERIAN**

Waktu (menit)	Kadar (10,44 mg) ug/ml	Kadar (7 mg) ug/ml	Kadar (7 mg) ug/ml	Kadar (7 mg) ug/ml	Kadar (7 mg) ug/ml	Kadar Total (ug/ml)
0	0					0
5	11.497					11.497
10	20.246					20.246
29	37.767					37.767
31	38.695	0				38.695
41	41.864	2.228				44.092
60	43.902	13.912				57.814
62	43.951	14.322	0			58.273
72	43.958	15.148	2.228			61.334
81	43.746	14.763	9.943			68.452
91	43.397	13.71	13.912			57.309
93	43.318	13.457	14.322	0		71.097
103	42.921	12.106	15.148	2.228		72.403
106	42.802	11.689	15.106	5.378		74.975
122	42.199	9.556	13.71	13.912		65.667
124	42.128	9.308	13.457	14.322	0	79.215
134	41.799	8.147	12.106	15.148	2.228	79.428
143	41.532	7.22	10.865	14.763	9.943	77.103
153	41.267	6.32	9.556	13.71	13.912	64.735
174	40.807	4.831	7.22	10.865	14,763	56.518
199	40.394	3.619	5.206	7.825	11.689	68.733
213	40.209	3.136	4.386	6.489	9.81	54.220
216	40.173	3.047	4.234	6.237	9.432	63.123
224	40.081	2.832	3.864	5.62	8.481	55.258
243	39.889	2.428	3.167	4.438	6.576	56.498
247	39.853	2.358	3.047	4.234	6.237	55.729
254	39.791	2.248	2.857	3.908	5.693	54.497
273	39.641	2.01	2.446	3.198	4.491	49.776
284	39.558	1.905	2.263	2.883	3.952	50.561
308	39.396	1.676	1.969	2.446	3.198	48.685
324	39.296	1.629	1.833	2.138	2.667	47.563
364	39.065	1.529	1.619	1.771	1.503	45.487
484	38.595	1.398	1.423	1.446	1.4.81	42.862
844	36.677	1.332	1.337	1.342	1.348	42.036
1554	33.443	1.214	1.219	1.224	1.229	38.329
7329	15.786	0.573	0.574	0.578	0.58	15.786
10219	10.842	0.394	0.395	0.397	0.398	10.842

Lampiran 27

UJI HIPOTESIS KEMAMPUAN TRIPANOSIDAL

270

Case Processing Summary

	Cases					
	Valid		Missing		Total	
	N	Percent	N	Percent	N	Percent
1= Positif, 2= Negatif * 1=Perlakuan, 2= Kontrol	14	100.0%	0	.0%	14	100.0%

1= Positif, 2= Negatif * 1=Perlakuan, 2= Kontrol Crosstabulation

Count

	1=Perlakuan, 2= Kontrol		Total
	1.00	2.00	
1= Positif, .00	7	7	7
2= Negatif 1.00	7	7	7
Total	7	7	14

Chi-Square Tests

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)
Pearson Chi-Square	14.000 ^b	1	.000		
Continuity Correction ^a	10.286	1	.001		
Likelihood Ratio	19.408	1	.000		
Fisher's Exact Test				.001	.000
Linear-by-Linear Association	13.000	1	.000		
N of Valid Cases	14				

a. Computed only for a 2x2 table

b. 4 cells (100.0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 3.50.

Lampiran 28

UJI HIPOTESIS KEL. MENCIT PERLAKUAN VS. KONTROL

Case Processing Summary

	Cases					
	Valid		Missing		Total	
	N	Percent	N	Percent	N	Percent
1= Sehat, 2 = Parasitemia * 1 = Mencit uji, 2 = Mencit kontrol	630	96.2%	25	3.8%	655	100.0%

1= Sehat, 2 = Parasitemia * 1 = Mencit uji, 2 = Mencit kontrol Crosstabulation

Count

	1 = Mencit uji, 2 = Mencit kontrol		Total
	1.00	2.00	
1= Sehat, 2 = .00	315	315	315
Parasitemia 1.00	315	315	315
Total	315	315	630

Chi-Square Tests

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)
Pearson Chi-Square	630.000 ^b	1	.000		
Continuity Correction ^a	626.006	1	.000		
Likelihood Ratio	873.365	1	.000		
Fisher's Exact Test				.000	.000
Linear-by-Linear Association	629.000	1	.000		
N of Valid Cases	630				

a. Computed only for a 2x2 table

b. 0 cells (.0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 157.50

Lampiran 29**UJI HIPOTESIS PERBEDAAN TIDAK DITEMUINYA GEJALA TOKSIK**

t-tests for independent samples of TOKSIK 1=Perlakuan,2=Kontrol

Variable	Number of Cases	Mean	SD	SE of Mean
KELOMPOK 1=Perlakuan,2=Kontrol				
TOKSIK 1	19	4.2105	1.653	.379
TOKSIK 2	19	4.7368	1.147	.263

Mean Difference = -.5263

Levene's Test for Equality of Variances: F= 3.565 P= .067

t-test for Equality of Means					95%
Variances	t-value	df	2-Tail Sig	SE of Diff	CI for Diff
Equal	-1.14	36	.262	.462	(-1.463, .410)
Unequal	-1.14	32.08	.263	.462	(-1.467, .414)

Lampiran 30.1**UJI HIPOTESIS PEMBESARAN UKURAN ORGAN HATI-1 DAN GINJAL-1 ANTAR PERLAKUAN**

t-tests for independent samples of UKURAN1

1=Perlakuan-1, 2=Kontrol sakit-1

Variable	Number of Cases	Mean	SD	SE of Mean
BENGKAK1 1=Perlakuan-1,2=Kontrol sakit-1				
UKURAN1 1	7	9.0714	6.051	2.287
cm	7	9.0143	6.325	2.391

Mean Difference = .0571

Levene's Test for Equality of Variances: F= .035 P= .855

t-test for Equality of Means					95%
Variances	t-value	df	2-Tail Sig	SE of Diff	CI for Diff
Equal	.02	12	.987	3.309	(-7.154, 7.268)
Unequal	.02	11.98	.987	3.309	(-7.154, 7.268)

Lampiran 30.2

UJI HIPOTESIS PEMBESARAN UKURAN ORGAN HATI-2 DAN GINJAL-2 ANTAR PERLAKUAN

t-tests for independent samples of UKURAN2

1=Perlakuan-2, 2=Kontrol sakit-2

Variable	Number of Cases	Mean	SD	SE of Mean
BENGKAK2 1=Perlakuan-2,2=Kontrol sakit-2				
UKURAN1 1	7	9.0000	5.583	2.110
cm	7	9.4429	6.434	2.432

Mean Difference = -.4429

Levene's Test for Equality of Variances: F= .915 P= .358

t-test for Equality of Means					95%
Variances	t-value	df	2-Tail Sig	SE of Diff	CI for Diff
Equal	-.14	12	.893	3.220	(-7.460, 6.574)
Unequal	-.14	11.77	.893	3.220	(-7.460, 6.574)

Lampiran 30.3

UJI HIPOTESIS PEMBESARAN UKURAN ORGAN HATI-3 DAN GINJAL-3 ANTAR PERLAKUAN

t-tests for independent samples of UKURAN3

1=Perlakuan-3, 2=Kontrol sakit-3

Variable	Number of Cases	Mean	SD	SE of Mean
BENGKAK3 1=Perlakuan-3,2=Kontrol sakit-3				
UKURAN1 1	7	8.9571	6.600	2.495
cm	7	9.3429	7.094	2.681

Mean Difference = -.3857

Levene's Test for Equality of Variances: F= .093 P= .766

t-test for Equality of Means					95%
Variances	t-value	df	2-Tail Sig	SE of Diff	CI for Diff
Equal	-.11	12	.918	3.662	(-8.367, 7.596)
Unequal	-.11	11.94	.918	3.662	(-8.367, 7.596)

Lampiran 30.4

UJI HIPOTESIS PEMBESARAN UKURAN ORGAN HATI-4 DAN GINJAL-4 ANTAR PERLAKUAN

t-tests for independent samples of UKURAN4

1=Perlakuan-4, 2=Kontrol sakit-4

Variable	Number of Cases	Mean	SD	SE of Mean
BENGKAK4 1=Perlakuan-4,2=Kontrol sakit-4				
UKURAN1 1	7	8.8714	5.760	2.177
cm	7	7.9714	4.922	1.860

Mean Difference = .9000

Levene's Test for Equality of Variances: F= .383 P= .548

t-test for Equality of Means					95%
Variances	t-value	df	2-Tail Sig	SE of Diff	CI for Diff
Equal	.31	12	.759	2.864	(-5.341, 7.141)
Unequal	.31	11.71	.759	2.864	(-5.341, 7.141)

Lampiran 30.5

UJI HIPOTESIS PEMBESARAN UKURAN ORGAN HATI-5 DAN GINJAL-5 ANTAR PERLAKUAN

t-tests for independent samples of UKURAN5

1=Perlakuan-5, 2=Kontrol sakit-5

Variable	Number of Cases	Mean	SD	SE of Mean
BENGKAK5 1=Perlakuan-5,2=Kontrol sakit-5				
UKURAN1 1	7	9.2143	6.304	2.383
cm	7	8.8429	5.917	2.236

Mean Difference = .3714

Levene's Test for Equality of Variances: F= .050 P= .827

t-test for Equality of Means					95%
Variances	t-value	df	2-Tail Sig	SE of Diff	CI for Diff
Equal	.11	12	.911	3.268	(-6.750, 7.493)
Unequal	.11	11.95	.911	3.268	(-6.750, 7.493)

Lampiran 31

UJI HIPOTESIS PADA PEMERIKSAAN HISTOPATOLOGI

274

Case Processing Summary

	Cases					
	Valid		Missing		Total	
	N	Percent	N	Percent	N	Percent
1 = Kelainan, 2 = Normal * 1 = Perlak, 2 =Kontrol	10	100.0%	0	.0%	10	100.0%

1 = Kelainan, 2 = Normal * 1 = Perlak, 2 =Kontrol Crosstabulation

Count

	1 = Perlak, 2 =Kontrol		Total
	0	1	
1 = Kelainan, 1		5	5
2 = Normal 2	5		5
Total	5	5	10

Chi-Square Tests

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)
Pearson Chi-Square	10.000 ^b	1	.002		
Continuity Correction ^a	6.400	1	.011		
Likelihood Ratio	13.863	1	.000		
Fisher's Exact Test				.008	.004
Linear-by-Linear Association	9.000	1	.003		
N of Valid Cases	10				

a. Computed only for a 2x2 table

b. 4 cells (100.0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 2.50.

Lampiran 32

PEMBERIAN BERULANG DIMINAZEN ASETURAT KAMBING SAKIT - 1
(intramuskular)

T (menit)	Cp (µg/ml)	T.Cp (µg/ml.menit)	T.Cp.Δt (µg/ml.menit ²)	AUC (µg/ml.menit)
0	0	0	0	0
5	15.877	79,385	198,463	39,693
30	32.163	964,890	13053,438	600,500
35	38.596	1350,860	5789,375	176,898
52	45.658	2374,216	31663,146	716,159
67	51,002	3417,134	43435,125	724,950
92	77,695	7147,940	132063,425	1608,713
106	76,944	8156,064	107128,028	1082,473
122	82,88	10111,360	146139,392	1278,592
151	45,151	6817,801	245472,835	1856,450
165	51,073	8427,045	106713,922	673,568
180	79,595	14327,100	170656,088	980,010
200	52,396	10479,200	24806300	1319,910
211	40,587	8563,857	104736,814	511,407
231	34,686	8012,466	165,763.230	752,730
261	28,348	7398,828	231169,410	945,510
304	26,801	8147,504	334246,138	1185,704
360	23,446	8440,560	464465,792	1406,916
815	22,535	18366,025	6098498,088	10460,678
1510	19,142	28904,420	16426479,638	14482,758
4290	15,918	68288,220	135097769,600	48733,400
7330	11,343	83144,190	230177263,200	41436,720
10130	9,932	100611,160	257257490	29785
MRT 11093,047 menit	ΣAUMC = 647608258,144		Σ AUC = 160758,74	
MRT 184,884 jam	AUMC * t ^{n→∞} = 2368091240		AUC ** t ^{n→∞} = 111096,20	
MRT 7,70 hari	AUMC 0 ^{→∞} = 3015699498,14		AUC 0 ^{→∞} = 271854,94	

$$*) AUMC_{t \rightarrow \infty} = \frac{Cp(n) \cdot Tn}{\beta} + \frac{Cp(n)}{\beta^2}$$

$$**) AUC_{t \rightarrow \infty} = \frac{Cpn}{\beta}$$

r = 0,9891 > rtab (5;0,05) = 0,754

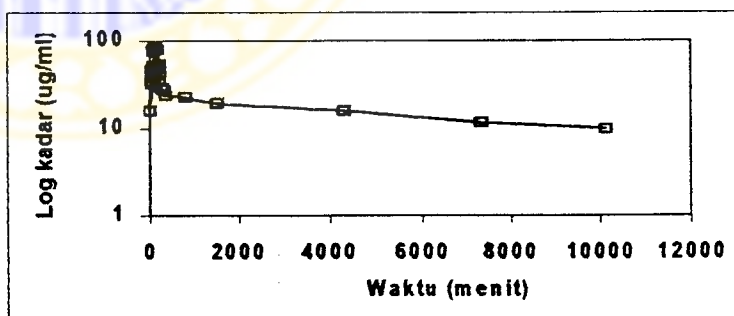
M = 23,331 µg/ml

β = 0,0000894 menit⁻¹

Pers (Cp) = 23,331.e^{-0,0000894.t}

Batas Kadar Terapi (Cp. min) = 13,29 µg/ml ⇒ Pers, t = 6144,165 menit

Waktu mempertahankan kadar = 6144,165 menit - 5 menit (t^{0.5}) = 6139,165 menit = 4,26 hari > 1 hari



Lampiran 33

PEMBERIAN BERULANG DIMINAZEN ASETURAT KAMBING SAKIT- 2 276
(intramuskular)

T (menit)	Cp (µg/ml)	T.Cp (µg/ml.menit)	T.Cp.Δt (µg/ml.menit ²)	AUC (µg/ml.menit)
0	0	0	0	0
13	23,796	309,35	2010,762	154,674
21	31,225	655,725	3860,292	220,084
34	33,839	1150,526	11740,632	422,916
53	57,79	3062,870	40027,262	870,476
71	60,221	4275,691	66047,049	1062,099
102	71,872	7330,944	179902,843	2047,442
111	77,507	8603,277	71703,995	672,206
124	82,69	10253,56	122569,441	1041,281
155	62,386	9669,830	308812,545	2248,678
169	88,53	14961,57	172419,80	1056,412
180	83,068	14952,24	164525,955	943,789
202	47,808	9657,216	270704,016	1439,636
211	34,02	7178,22	75759,462	368,226
231	22,477	5192,187	123704,070	564,970
259	19,358	5013,722	142882,726	585,690
304	16,382	4980,128	224861,625	804,150
362	15,608	5650,096	308276,496	927,710
807	14,533	11728,131	3866655,508	6706,373
2238	13,928	31170,864	30694230,923	20363,846
4297	12,559	53966,023	87648425,167	27268,367
7333	10,161	74510,613	195027533,448	34488,960
10152	10,012	101641,824	248286859,952	28433,844
MRT 21008,093 menit		ΣAUMC = 567813513,965	Σ AUC = 132691,825	
MRT 350,13 jam		AUMC * t _n →∞ = 6694959587	AUC ** t _n →∞ = 213021,277	
MRT 14,59 hari		AUMC 0→∞ = 7262773100,97	AUC 0→∞ = 345713,10	

$$*) AUMC_{t_n \rightarrow \infty} = \frac{Cp(n).Tn}{\beta} + \frac{Cp(n)}{\beta^2}$$

$$**) AUC_{t_n \rightarrow \infty} = \frac{Cpn}{\beta}$$

r = 0,975 > r_{tab} (5;0,05) = 0,754

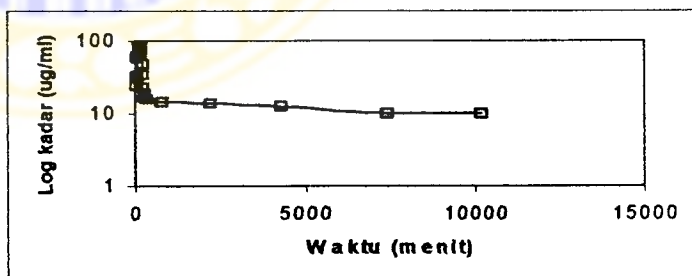
M = 15,374 µg/ml

β = 0,000047 menit⁻¹

Pers (Cp) = 15,374.e^{-0,000047.t}

Batas Kadar Terapi (Cp. min) = 13,29 µg/ml ⇒ Pers, t = 3191,489 menit

Waktu mempertahankan kadar = 3191,489 menit - 13 menit (t⁰⁻¹³) = 3178,489 menit = 2,2 hari. > 1 hari



Lampiran 34

PEMBERIAN BERULANG DIMINAZEN ASETURAT KAMBING SAKIT - 3
(intramuskular)

277

T (menit)	Cp ($\mu\text{g/ml}$)	T.Cp ($\mu\text{g/ml.menit}$)	T.Cp. Δt ($\mu\text{g/ml.menit}^2$)	AUC ($\mu\text{g/ml.menit}$)
0	0	0	0	0
6	20,912	125,47	376,416	62,736
12	31,117	373,40	1496,628	156,087
33	39,626	1307,66	17651,151	742,802
50	41,008	2050,40	28543,493	685,389
81	58,994	4778,51	105848,167	1550,031
106	60,585	6422,01	140006,550	1494,738
122	51,337	6263,11	101480,992	895,376
135	87,438	11804,13	117437,086	902,038
149	65,444	9751,16	150887,002	1070,174
161	56,194	9047,23	112790,340	729,828
166	65,349	10847,93	49737,920	303,858
182	52,632	9579,02	163415,664	943,848
203	50,347	10220,44	207894,383	1081,280
234	46,698	10927,33	327790,482	1504,198
254	40,137	10194,80	211221,300	868,350
294	32,989	9698,77	397871,280	1462,520
369	30,415	11223,14	784571,288	2377,650
1209	22,501	27203,71	16139274,480	22224,720
1444	19,187	27706,03	6451894,098	4898,340
4321	14,755	63756,36	131568637,946	48825,567
7186	10,646	76502,16	200920317,008	36386,933
10084	8,069	81367,80	228753560,448	27118,035
MRT 7626,97 menit		$\Sigma \text{AUMC} = 86752704,119$	$\Sigma \text{AUC} = 156284,495$	
MRT 127,12 jam		$\text{AUMC} * t_{n \rightarrow \infty} = 1067947135$	$\text{AUC} ** t_{n \rightarrow \infty} = 60669,17$	
MRT 5,2 hari		$\text{AUMC}^0 \rightarrow \infty = 1654699839,12$	$\text{AUC}^0 \rightarrow \infty = 216953,66$	

$$*) \text{AUMC } t_{n \rightarrow \infty} = \frac{Cp(n).Tn}{\beta} + \frac{Cp(n)}{\beta^2}$$

$$**) \text{AUC } t_{n \rightarrow \infty} = \frac{Cpn}{\beta}$$

$$r = 0,96658 > r_{\text{tab}}(6;0,05) = 0,707$$

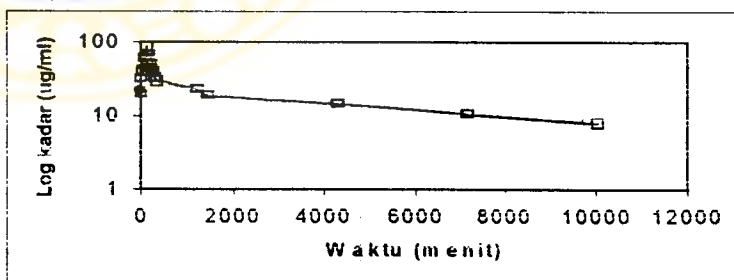
$$M = 28,462 \mu\text{g/ml}$$

$$\beta = 0,000133 \text{ menit}^{-1}$$

$$\text{Pers (Cp)} = 28,462 \cdot e^{-0,000133 \cdot t}$$

$$\text{Batas Kadar Terapi (Cp. min)} = 13,29 \mu\text{g/ml} \Rightarrow \text{Pers, } t = 5633,0253 \text{ menit}$$

$$\text{Waktu mempertahankan kadar} = 5633,0253 \text{ menit} - 6 \text{ menit}^{(t_0-t)} = 3174,745 \text{ menit} = 3,91 \text{ hari} > 1 \text{ hari}$$



Lampiran 35

PEMBERIAN BERULANG DIMINAZEN ASETURAT KAMBING SAKIT - 4
(Intramuskular)

T (menit)	Cp (µg/ml)	T.Cp (µg/ml.menit)	T.Cp.Δt (µg/ml.menit ²)	AUC (µg/ml.menit)
0	0	0	0	0
6	20,84	125,040	375,12	62,520
13	28,15	365,950	1718,47	171,465
36	34,564	1244,304	18517,92	721,211
58	41,813	2425,154	40364,04	840,147
85	46,689	3968,565	86315,21	1194,777
109	55,746	6076,314	120538,55	1229,220
125	65,799	8224,875	114409,51	972,360
136	57,863	7869,368	88518,34	680,141
148	65,871	9748,908	105709,66	742,404
162	67,503	10935,486	144790,76	933,618
171	42,13	7204,230	81628,72	493,349
185	33,76	6245,600	94148,81	531,230
208	32,749	6811,792	150160,01	764,854
236	22,505	5311,180	169721,61	773,556
252	21,428	5399,856	85688,29	351,464
296	17,594	5207,824	233368,96	858,484
1192	16,661	19859,912	11230345,73	15346,240
1456	16,201	23588,656	5735210,98	4337,784
4331	15,56	67390,360	130782335,50	45656,438
7185	15,514	111468,090	255231008,15	44342,598
10101	10,585	106919,085	318408501,15	38052,342
MRT 21117,220 menit		ΣAUMC = 722923375,461		Σ AUC = 159056,201
MRT 351,95 jam		AUMC * t _n →∞ = 7603140161		AUC ** t _n →∞ = 235222,2
MRT 14,66 hari		AUMC 0→∞ = 8326063536,461		AUC 0→∞ = 394278,4

$$*) AUMC_{t_n \rightarrow \infty} = \frac{Cp(n) \cdot T_n}{\beta} + \frac{Cp(n)}{\beta^2}$$

$$**) AUC_{t_n \rightarrow \infty} = \frac{Cp_n}{\beta}$$

r = 0.849 > r_{tab} (4;0,05) = 0,811

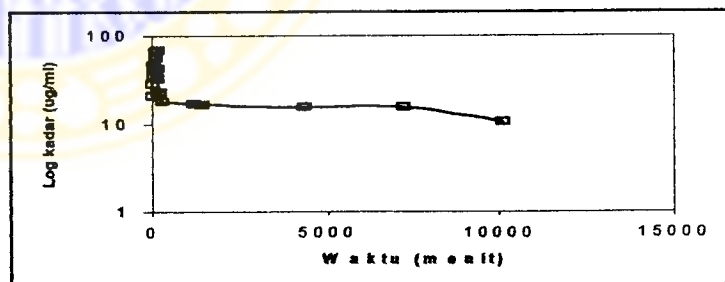
M = 17,999 µg/ml

β = 0,0000415 menit⁻¹

Pers (Cp) = 17,999.e^{-0,0000415.t}

Batas Kadar Terapi (Cp. min) = 13,29 µg/ml ⇒ Pers, t = 7228,916 menit

Waktu mempertahankan kadar = 7228,916 menit - 6 menit (t₀₋₆) = 7222,916 menit = 5,01 hari > 1 hari



Lampiran 36

PEMBERIAN BERULANG DIMINAZEN ASETURAT KAMBING SAKIT - 5
(Intramuskular)

279

T (menit)	Cp (µg/ml)	T.Cp (µg/ml.menit)	T.Cp.Δt (µg/ml.menit ²)	AUC (µg/ml.menit)
0	0	0	0	0
12	35,81	429,720	2578,32	214,860
15	39,816	597,240	1540,44	113,439
37	40,592	1501,904	23090,58	884,488
50	44,02	2201	24068,88	549,978
78	51,642	4028,076	87207,06	1339,268
89	60,957	5425,173	51992,87	619,295
120	62,179	7461,480	199743,12	1908,608
125	67,095	8386,875	39620,89	323,185
130	62,841	8169,330	41390,51	324,840
135	53,53	7226,550	38489,70	290,928
142	39,233	5571,086	44791,73	324,671
155	33,457	5185,835	69919,99	472,485
164	29,154	4781,256	44851,91	281,750
215	27,719	5959,585	273891,45	1450,262
230	26,107	6004,610	89731,46	403,695
247	24,159	5967,273	101761,01	427,261
417	21,502	8,966.334	1269356,60	3881,185
685	20,638	14137,030	3095850,78	5646,760
1440	19,913	28674,720	16161435,63	15308,003
5775	18,032	104134,800	287864634,60	82245,788
7175	13,37	95929,750	140045185	21981,400
10055	12,3	123676,500	316233	36964,800
MRT 16222,246 menit		ΣAUMC = 765804132,51		ΣAUC = 175956,95
MRT 270.37 jam		AUMC * t ^{n→∞} = 5375822312		AUC ** t ^{n→∞} = 202635,914
MRT 11.27 hari		AUMC 0 ^{n→∞} = 6141626444,51		AUC 0 ^{n→∞} = 378592,86

$$*) AUMC_{t \rightarrow \infty} = \frac{Cp(n) \cdot Tn}{\beta} + \frac{Cp(n)}{\beta^2}$$

$$**) AUC_{t \rightarrow \infty} = \frac{Cpn}{\beta}$$

$$r = 0,953 > r_{tab}(6; 0,05) = 0,707$$

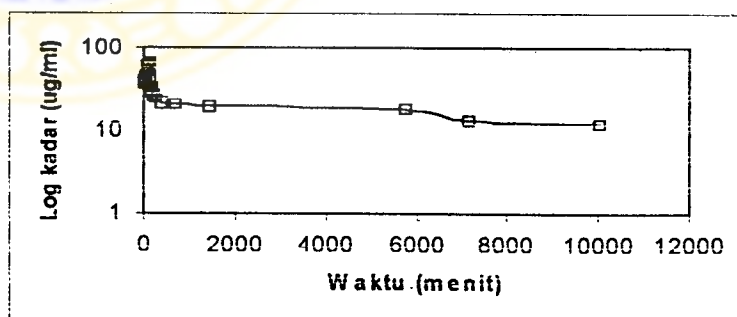
$$M = 22,623 \mu\text{g/ml}$$

$$\beta = 0,0000607 \text{ menit}^{-1}$$

$$\text{Pers (Cp)} = 22,623 \cdot e^{-0,0000607 \cdot t}$$

$$\text{Batas Kadar Terapi (Cp. min)} = 13,29 \mu\text{g/ml} \Rightarrow \text{Pers, } t = 8231,608 \text{ menit}$$

$$\text{Waktu mempertahankan kadar} = 8231,608 \text{ menit} - 12 \text{ menit } (t^{0-12}) = 8219,608 \text{ menit} = 5,71 \text{ hari. } > 1 \text{ hari}$$



Lampiran 37

280

PEMBERIAN BERULANG DIMINAZEN ASETURAT KAMBING SEHAT - 1
 (intramuskular)

T (menit)	Cp (µg/ml)	T.Cp (µg/ml.menit)	T.Cp.Δt (µg/ml.menit ²)	AUC (µg/ml.menit)
0	0	0	0	0
5	17,597	87,985	219,963	43,993
10	27,927	279,270	918,138	113,810
12	30,442	365,304	644,574	58,369
21	34,928	733,488	4944,564	294,165
26	35,881	932,906	4165,985	177,023
45	42,923	1931,535	27212,190	748,638
66	43,495	2870,670	50423,153	907,389
81	54,750	4434,750	54790,650	736,838
95	66,468	6314,460	75244,470	848,526
106	64,296	6815,376	72214,098	719,202
122	56,856	6936,432	110014,464	969,216
126	57,014	7183,764	28240,392	227,740
132	70,573	9315,636	49498,200	382,761
149	51,725	7707,025	144692,619	1039,533
155	48,484	7515,020	45666,135	300,627
177	43,316	7666,932	167001,472	1009,800
240	22,419	5380,560	410995,998	2070,653
630	20,695	13037,850	3591589,950	8407,230
1567	19,471	30511,057	20402662,930	18817,771
4340	13,818	59970,120	125452151,911	46155,199
10040	9,967	100068,680	456110580	67787,250
MRT 12106,38 menit		ΣAUMC = 606803871,850	ΣAUC = 151815,730	
MRT 201,77 jam		AUMC * $t_{n \rightarrow \infty}$ = 2702651957	AUC ** $t_{n \rightarrow \infty}$ = 121548,800	
MRT 8,41 hari		AUMC $0 \rightarrow \infty$ = 3309455828,850	AUC $0 \rightarrow \infty$ = 273364,530	

$$*) AUMC_{t \rightarrow \infty} = \frac{Cp(n) \cdot Tn}{\beta} + \frac{Cp(n)}{\beta^2}$$

$$**) AUC_{t \rightarrow \infty} = \frac{Cpn}{\beta}$$

$$r = 0,984 > r_{tab}(3;0,05) = 0,878$$

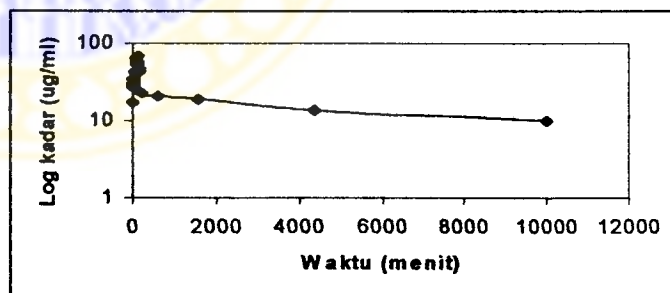
$$M = 21,261 \mu\text{g/ml}$$

$$\beta = 0,0000786 \text{ menit}^{-1}$$

$$\text{Pers (Cp)} = 21,261 \cdot e^{-0,0000786 \cdot t}$$

$$\text{Batas Kadar Terapi (Cp. min)} = 13,29 \mu\text{g/ml} \Rightarrow \text{Pers, } t = 6361,323 \text{ menit}$$

$$\text{Waktu mempertahankan kadar} = 6361,323 \text{ menit} - 5 \text{ menit}^{(t-5)} = 6356,323 \text{ menit} = 4,41 \text{ hari.} > 1 \text{ hari}$$



Lampiran 38

PEMBERIAN BERULANG DIMINAZEN ASETURAT KAMBING SEHAT - 2
(intramuskular)

T (menit)	Cp (µg/ml)	T.Cp (µg/ml.menit)	T.Cp.Δt (µg/ml.menit ²)	AUC (µg/ml.menit)
0	0	0	0	0
5	17,990	89,950	224,875	44,975
13	27,927	363,051	1812,004	183,668
20	38,090	761,800	3936,979	231,060
25	38,422	960,550	4305,875	191,280
45	45,239	2035,755	29963,050	836,610
65	52,256	3396,640	54323,950	974,950
87	56,188	4888,356	91134,956	1192,884
98	57,668	5651,464	57969,010	626,208
104	61,690	6415,760	36201,672	358,074
121	55,607	6728,447	111725,760	997,025
126	70,349	8863,974	38981,053	314,890
132	75,025	9903,300	56301,822	436,122
143	56,105	8023,015	98594,733	721,215
165	39,277	6480,705	159540,920	1049,202
183	35,832	6557,256	117341,649	675,981
220	35,824	7881,280	267112,916	1325,636
243	24,279	5899,797	158482,386	691,185
629	18,649	11730,221	3402593,474	8285,104
1568	12,767	20018,656	14906097,752	14749,812
4343	11,843	51434,149	99140766,938	34146,375
7205	10,001	72057,205	176716127,574	31258,764
10080	7,939	80025,120	218618342,188	25788,750
MRT 13,742.447 menit		ΣAUMC = 514071881,532	ΣAUC = 125079,769	
MRT 229.04 jam		AUMC * t ^{n→∞} = 2763420082	AUC * * t ^{n→∞} = 113414,286	
MRT 9.54 hari		AUMC 0→∞ = 3277491963,532	AUMC 0→∞ = 238494,055	

*) $AUMC_{t \rightarrow \infty} = \frac{Cp(n) \cdot Tn}{\beta} + \frac{Cp(n)}{\beta^2}$

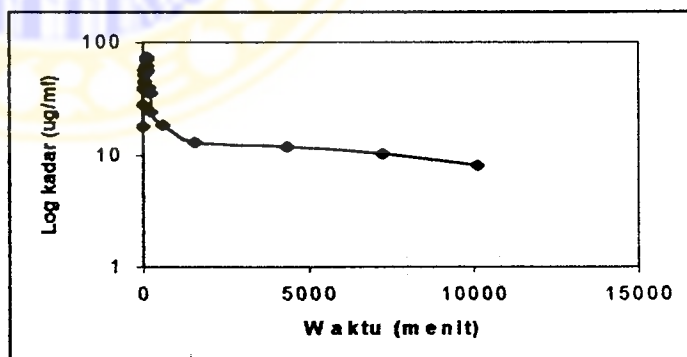
***) $AUC_{t \rightarrow \infty} = \frac{Cp \cdot n}{\beta}$

$r = 0,9372 > r_{tab}(4;0,05) = 0,754$

$M = 16,833 \mu\text{g/ml}$

$\beta = 0,0000756 \text{ menit}^{-1}$

Pers (Cp) = $16,833 \cdot e^{-0,0000756 \cdot t}$



Batas Kadar Terapi (Cp. min) = 13,29 µg/ml ⇒ Pers, t = 3313,105 menit

Waktu mempertahankan kadar = 3313,105 menit - 5 menit (t^{0.5}) = 3308,106 menit = 2,3 hari. > 1 hari

Lampiran 39

PEMBERIAN BERULANG DIMINAZEN ASETURAT KAMBING SEHAT - 3
(intramuskular)

282

T (menit)	Cp (µg/ml)	T.Cp (µg/ml.menit)	T.Cp.Δt (µg/ml.menit ²)	AUC (µg/ml.menit)
0	0	0	0	0
6	21,669	130,014	390,04	65,007
13	26,32	342,160	1652,61	167,962
21	32,543	683,403	4102,25	235,452
28	34,41	963,480	5764,09	234,336
47	40,319	1894,993	27155,49	709,926
66	53,514	3531,924	51555,71	891,414
87	55,066	4790,742	87387,99	1140,090
100	61,705	6170,500	71248,07	759,012
106	66,207	7017,942	39565,33	383,736
121	67,136	8123,456	113560,49	1000,073
126	69,186	8717,436	42102,23	340,805
130	71,336	9273,680	35982,23	281,044
148	66,092	9781,616	171497,66	1236,852
164	59,21	9710,440	155936,45	1002,416
182	58,205	10593,310	182733,75	1056,735
240	55,533	13327,920	693715,67	3298,402
631	32,139	20279,709	6570291,47	17139,876
850	22,32	18972	4298062,14	5963,261
1466	13,628	19978,648	11996799,58	11071,984
4320	12,568	54293,760	105986726,22	37381,692
7205	9,993	71999,565	182178121,31	32544,243
10033	8,362	83895,946	220436252,55	25953,970
MRT 13227,904 menit		ΣAUMC =	533150603,34	ΣAUC = 142858,28
MRT 220,47 jam		AUMC * t ^{n→∞} =	2953154739	AUMC ** t ^{n→∞} = 120698,61
MRT 9,19 hari		AUMC 0→∞ =	3486305342,34	AUC 0→∞ = 263556,90

$$*) AUMC_{t \rightarrow \infty} = \frac{Cp(n) \cdot Tn}{\beta} + \frac{Cp(n)}{\beta^2}$$

$$**) AUC_{t \rightarrow \infty} = \frac{Cpn}{\beta}$$

$$r = 0,985 > r_{tab}(3;0,05) = 0,878$$

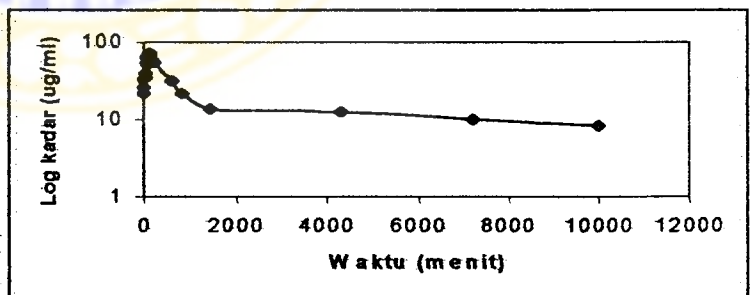
$$M = 15,386 \mu\text{g/ml}$$

$$\beta = 0,00005928 \text{ menit}^{-1}$$

$$\text{Pers (Cp)} = 15,386 \cdot e^{-0,00005928 \cdot t}$$

$$\text{Batas Kadar Terapi (Cp. min)} = 13,29 \mu\text{g/ml} \Rightarrow \text{Pers, } t = 2530,364 \text{ menit}$$

$$\text{Waktu mempertahankan kadar} = 2530,364 \text{ menit} - 6 \text{ menit}^{(t \rightarrow 0)} = 2524,364 \text{ menit} = 1,75 \text{ hari} > 1 \text{ hari}$$



Lampiran 40

283

PEMBERIAN BERULANG DIMINAZEN ASETURAT KAMBING SEHAT- 4
(Intramuskular)

T (menit)	Cp (µg/ml)	T.Cp (µg/ml.menit)	T.Cp.Δt (µg/ml.menit ²)	AUC (µg/ml.menit)
0	0	0	0	0
6	20,84	125,04	375,120	62,520
13	28,15	365,95	1718,465	171,465
36	34,564	1244,30	18517,921	721,211
58	41,813	2425,15	40364,038	840,147
85	46,689	3968,57	86315,207	1194,777
109	55,746	6076,31	120538,548	1229,220
125	66,799	8349,88	115409,512	980,360
136	57,863	7869,37	89205,837	685,641
148	65,871	9748,91	105709,656	742,404
162	67,503	10935,49	144790,758	933,618
171	42,13	7204,23	81628,722	493,349
185	33,76	6245,60	94148,810	531,230
208	32,749	6811,79	150160,008	764,854
236	22,505	5311,18	169721,608	773,556
252	21,428	5399,86	85688,288	351,464
296	17,594	5207,82	233368,960	858,484
1192	16,661	19859,91	11230345,728	15346,240
1456	16,201	23588,66	5735210,976	4337,784
4331	15,56	67390,36	130782335,500	45656,438
7185	15,514	111468,09	255231008,150	44342,598
10101	10,585	106919,09	318408501,150	38052,342
MRT 21116,501 menit		ΣAUMC = 722925062,960		ΣAUC = 159069,701
MRT 351,94 jam		AUMC * $t_n \rightarrow \infty$ = 7603140161		AUC * $t_n \rightarrow \infty$ = 235222,20
MRT 14,66 hari		AUMC $t \rightarrow \infty$ = 8326065223,96		AUC $t \rightarrow \infty$ = 394291,901

$$*) AUMC_{t \rightarrow \infty} = \frac{Cp(n).Tn}{\beta} + \frac{Cp(n)}{\beta^2}$$

$$**) AUC_{t \rightarrow \infty} = \frac{Cpn}{\beta}$$

$$r = 0,849 > r_{tab}(4;0,05) = 0,811$$

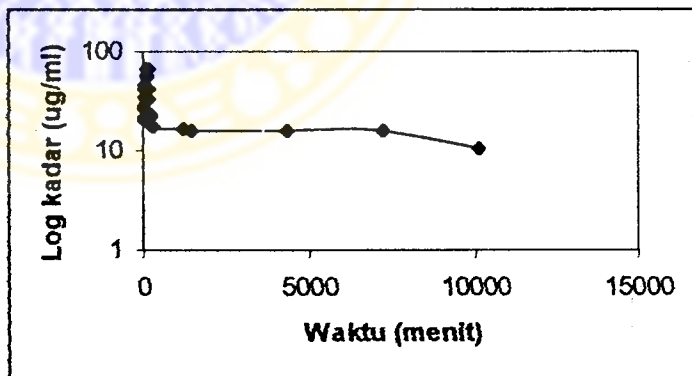
$$M = 17,999 \mu\text{g/ml}$$

$$\beta = 0,0000415 \text{ menit}^{-1}$$

$$\text{Pers (Cp)} = 17,999.e^{-0,0000415.t}$$

$$\text{Batas Kadar Terapi (Cp. min)} = 13,29 \mu\text{g/ml} \Rightarrow \text{Pers, } t = 7228,916 \text{ menit}$$

$$\text{Waktu mempertahankan kadar} = 7228,916 \text{ menit} - 6 \text{ menit } (t_{0-6}) = 7222,916 \text{ menit} = 5,02 \text{ hari} > 1 \text{ hari}$$



Lampiran 41.

PEMBERIAN BERULANG DIMINAZEN ASETURAT KAMBING SEHAT- 5 284
(Intramuskular)

T (menit)	Cp (µg/ml)	T.Cp (µg/ml.menit)	T.Cp.Δt (µg/ml.menit ²)	AUC (µg/ml.menit)
0	0	0	0	0
8	28,722	229,776	919,10	114,888
16	34,755	556,080	3143,42	253,908
30	38,702	1161,060	12019,98	514,199
40	39,932	1597,280	13791,70	393,170
52	57,737	3002,324	27597,62	586,014
77	71,003	5467,231	105869,44	1609,250
97	69,549	6746,253	122134,84	1405,520
106	46,199	4897,094	52395,06	520,866
114	70,555	8043,270	51761,46	467,016
136	60,866	8277,776	179531,51	1445,631
143	55,955	8001,565	56977,69	408,874
153	64,34	9844,020	89227,93	601,475
172	42,872	7373,984	163571,04	1018,514
184	41,383	7614,472	89930,74	505,530
207	39,392	8154,144	181339,08	928,913
228	32,574	7,426.872	163600,67	755,643
260	29,541	7680,660	241720,51	993,840
715	20,985	15004,275	5160822,71	11494,665
1480	17,297	25599,560	15530966,89	14642,865
4265	15,769	67254,785	129299675,41	46044,405
7170	14,986	107449,620	253758148,26	44671,638
10143	10,327	104746,761	315429920,36	37627,775
MRT 15257,56 menit		ΣAUMC = 20735065,42		ΣAUC = 167004,6
MRT 254,29 jam		AUMC * $t_{n \rightarrow \infty}$ = 4364622501		AUC ** $t_{n \rightarrow \infty}$ = 166296,3
MRT 10,60 hari		AUMC $0 \rightarrow \infty$ = 5085357566,42		AUC $0 \rightarrow \infty$ = 333300,89

*) AUMC $t_{n \rightarrow \infty}$

$$\frac{Cp(n) \cdot Tn}{\beta} + \frac{Cp(n)}{\beta^2}$$

$$**) AUC $t_{n \rightarrow \infty} = \frac{Cpn}{\beta}$$$

$$r = 0,942 > r_{tab}(4;0,05) = 0,811$$

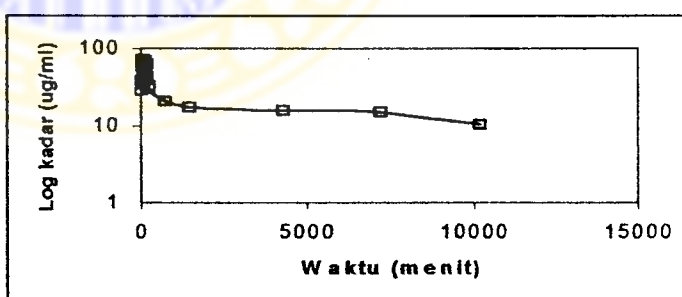
$$M = 20,785 \mu\text{g/ml}$$

$$\beta = 0,0000621 \text{ menit}^{-1}$$

$$\text{Pers}(Cp) = 20,785 \cdot e^{-0,0000621 \cdot t}$$

$$\text{Batas Kadar Terapi}(Cp. \text{min}) = 13,29 \mu\text{g/ml} \Rightarrow \text{Pers}, t = 7246,377 \text{ menit}$$

$$\text{Waktu mempertahankan kadar} = 7246,377 \text{ menit} - 8 \text{ menit} (t^{0-8}) = 7238,377 \text{ menit} = 5,03 \text{ hari} > 1 \text{ hari}$$



Lampiran 44

PERHITUNGAN PERKIRAAN WAKTU PENGOBATAN ULANG

Kode	Persamaan Cp ($\mu\text{g/ml}$)	Waktu awal (menit)	Waktu (menit) pada kadar (Cp) 7,702 $\mu\text{g/ml}$	Σ waktu (hari)	Waktu (menit) pada kadar (Cp) 8,482 $\mu\text{g/ml}$	Σ waktu (hari)
Sakit-1	$23,331 \cdot e^{-0,0000894 \cdot t}$	5	12299,711 menit	8,54	10622,477 menit	7,37
Sakit-2	$15,374 \cdot e^{-0,0000471 \cdot t}$	13	14893,617 menit	10,33	12765,957 menit	8,86
Sakit-3	$28,462 \cdot e^{-0,0001331 \cdot t}$	6	9763,911 menit	6,78	9012,941 menit	6,25
Sakit-4	$17,999 \cdot e^{-0,0000415 \cdot t}$	6	20481,928 menit	14	18144,578 menit	12,6
Sakit-5	$22,623 \cdot e^{-0,0000607 \cdot t}$	12	18109,538 menit	12,57	16463,217 menit	11,42
Sehat-1	$21,261 \cdot e^{-0,0000786 \cdot t}$	5	12595,42 menit	8,74	11450,382 menit	7,95
Sehat-2	$16,833 \cdot e^{-0,0000756 \cdot t}$	5	10601,937 menit	7,36	9276,695 menit	6,44
Sehat-3	$15,386 \cdot e^{-0,0000591 \cdot t}$	6	11808,367 menit	8,2	9951,08 menit	6,91
Sehat-4	$17,999 \cdot e^{-0,0000415 \cdot t}$	8	20481,928 menit	14,22	18072,289 menit	12,54
Sehat-5	$20,785 \cdot e^{-0,0000621 \cdot t}$	6	16096,633 menit	11,17	14486,97 menit	10,06
Rerata				$10,19 \pm 2,7$		$9,04 \pm 2,5$

Lampiran 44

PERHITUNGAN PERKIRAAN WAKTU PENGOBATAN ULANG

Kode	Persamaan Cp ($\mu\text{g/ml}$)	Waktu awal (menit)	Waktu (menit) pada kadar (Cp) 7,702 $\mu\text{g/ml}$	Σ waktu (hari)	Waktu (menit) pada kadar (Cp) 8,482 $\mu\text{g/ml}$	Σ waktu (hari)
Sakit-1	$23,331 \cdot e^{-0,0000894 \cdot t}$	5	12299,711 menit	8,54	10622,477 menit	7,37
Sakit-2	$15,374 \cdot e^{-0,000047 \cdot t}$	13	14893,617 menit	10,33	12765,957 menit	8,86
Sakit-3	$28,462 \cdot e^{-0,000133 \cdot t}$	6	9763,911 menit	6,78	9012,941 menit	6,25
Sakit-4	$17,999 \cdot e^{-0,0000415 \cdot t}$	6	20481,928 menit	14	18144,578 menit	12,6
Sakit-5	$22,623 \cdot e^{-0,0000607 \cdot t}$	12	18109,538 menit	12,57	16463,217 menit	11,42
Sehat-1	$21,261 \cdot e^{-0,0000786 \cdot t}$	5	12595,42 menit	8,74	11450,382 menit	7,95
Sehat-2	$16,833 \cdot e^{-0,0000756 \cdot t}$	5	10601,937 menit	7,36	9276,695 menit	6,44
Sehat-3	$15,386 \cdot e^{-0,000059 \cdot t}$	6	11808,367 menit	8,2	9951,08 menit	6,91
Sehat-4	$17,999 \cdot e^{-0,0000415 \cdot t}$	8	20481,928 menit	14,22	18072,289 menit	12,54
Sehat-5	$20,785 \cdot e^{-0,0000621 \cdot t}$	6	16096,633 menit	11,17	14486,97 menit	10,06
Rerata				$10,19 \pm 2,7$		$9,04 \pm 2,5$