

To A  
TOXOPLASMA

**PENINGKATAN TITER IMUNOGLOBULIN A MUKOSA USUS HALUS  
MENCIT (*MUS MUSCULUS*) SESUDAH PEMBERIAN PROTEIN  
SOLUBEL *TOXOPLASMA GONDII* DENGAN ATAU TANPA  
AJUVAN TOKSIN KOLERA SECARA INTRANASAL**

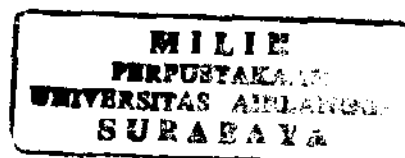
TKD 07/05  
Zub  
P

TESIS

Untuk Memperoleh Gelar Magister  
Dalam Program Studi Ilmu Kedokteran dasar  
pada Program Pascasarjana Universitas Airlangga

Oleh :

MONA ZUBAIDAH  
090214727M



**PROGRAM PASCASARJANA  
UNIVERSITAS AIRLANGGA  
SURABAYA  
Tanggal 15 September 2004**

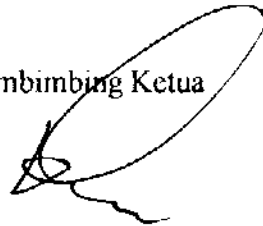
**Lembar pengesahan**

TESIS INI TELAH DISETUJUI

TANGGAL 15 September 2004

Oleh

Pembimbing Ketua

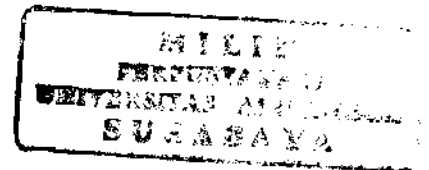


Prof. H. Soedarto, dr, DTM & H, Ph.D  
NIP. 130 350 713

Pembimbing



Dra. Heny Arwati, MSc. Ph.D  
NIP. 131 932 683



Mengetahui

Ketua Program Studi Ilmu Kedokteran Dasar

Program Pascasarjana

Universitas Airlangga

Prof. Retno Handajani, dr, MS, Ph.D

NIP. 130 541 984

Telah diuji pada

Tanggal 15 September 2004

### PANITIA PENGUJI TESIS

Ketua : Prof. DR. Rochiman Sasmita, drh,MS

Anggota : 1. Prof Soedarto, dr, DTM&H, Ph.D

2. Dra. Heny Arwati, MSc.Ph.D

3. Machfudz, dr, DTM&H,MS

4. Muh. Cholil Munif, dr, AIF



## UCAPAN TERIMA KASIH

Dengan segala kerendahan hati saya panjatkan puji syukur kehadirat Allah SWT yang Maha Pengasih lagi Maha Penyayang atas segala berkat, rahmat, hidayah dan karuniaNya sehingga tesis ini dapat diselesaikan.

Dengan selesainya tesis ini perkenankanlah saya mengucapkan penghargaan dan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada:

Pemerintah Republik Indonesia dalam hal ini Pemerintah Daerah Tingkat I Kalimantan Timur, yang telah memberikan dana pendidikan untuk mengikuti dan menyelesaikan pendidikan program Magister Ilmu Kedokteran Dasar di program Pascasarjana Universitas Airlangga Surabaya.

Rektor Universitas Airlangga, Prof. DR. Med Puruhito, SpBTKV atas ijin dan kesempatan yang diberikan kepada saya untuk mengikuti program Magister pada Program Pascasarjana Universitas Airlangga Surabaya.

Ketua Program Studi Ilmu Kedokteran Dasar Program Pascasarjana Universitas Airlangga, Prof. Retno Handajani dr, MS, Ph.D atas pengarahan dan petunjuk yang diberikan sehingga saya dapat menyelesaikan pendidikan program Magister.

Prof. H. Soedarto, dr, DTM & H, Ph.D, sebagai pembimbing ketua yang telah memberikan bimbingan, arahan serta dorongan semangat dengan penuh kesabaran yang sangat berharga bagi saya sampai selesainya tesis ini.

Dra. Heny Arwati, MSc. Ph.D, sebagai pembimbing yang telah memberikan bimbingan, arahan serta dorongan yang penuh perhatian sampai selesainya tesis ini.

Dr. Wayan T. Artama selaku Direktur Bioteknologi Universitas Gajah Mada beserta staf dan teknisi laboratorium atas bantuannya dalam pelaksanaan penelitian ini. Juga kepada Didik Tulus Subekti VMD., M.Med.Sc., yang dengan penuh kesabaran dan keikhlasan membantu kami dalam pelaksanaan penelitian ini.

Teman-teman mahasiswa Pascasarjana Program Studi Ilmu Kedokteran Dasar Program Studi Parasitologi khususnya angkatan 2002/2003, Ocky Dwi S, dan Moriko Pratiningrum atas kerjasamanya dengan penuh persaudaraan selama saya mengikuti pendidikan Pascasarjana. Juga kepada Drh. Dinal Rifqi yang telah dengan tulus memberikan dukungan semangat dan bantuan selama ini.

Pada kesempatan ini saya ingin menyampaikan ucapan terima kasih yang tak terhingga dan penghargaan yang setinggi-tingginya kepada kedua orangtua dan saudara-saudara saya yang penuh kasih sayang dan kesabaran atas doa restunya, pengertian dan dorongan semangat serta bantuan yang tak terhingga sampai saat ini.

Semoga Allah SWT memberikan pahala yang berlimpah atas semua amal dan budi baik yang telah diberikan.

## RINGKASAN

**Peningkatan Titer Immunoglobulin A Mukosa Usus Halus  
Mencit (*Mus musculus*) sesudah Pemberian Protein  
Solubel *Toxoplasma gondii* dengan atau tanpa  
Ajuvan Toksin Kolera Secara Intranasal**

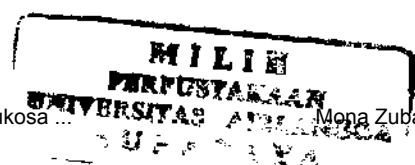
Mona Zubaidah

Pada patogenesis toksoplasmosis secara alamiah, mukosa saluran usus merupakan tempat awal masuknya infeksi parasit ini, oleh karena itu respon imun humoral terhadap toksoplasmosis yang bersifat lokal terutama terjadi pada permukaan mukosa saluran usus dan diperankan oleh immunoglobulin A (IgA). Penggunaan protein solubel (SPTAg) dimaksudkan untuk menginduksi respon imun, dengan aplikasi intranasal yang merupakan salah satu rute imunisasi yang efektif untuk menginduksi respon imun. Ajuvan CT digunakan untuk memperbaiki dan meningkatkan kemampuan sistem imun mukosa untuk merespon SPTAg yang diberikan.

Penelitian ini secara umum bertujuan untuk mengetahui gambaran dan perbedaan respon imun IgA mukosa usus hewan coba yang diimunisasi dengan SPTAg *T. gondii* yang diaplikasikan secara intranasal dengan atau tanpa menggunakan ajuvan CT.

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental yang menggunakan rancangan faktorial *post test only*, menggunakan 48 ekor mencit, dibagi dalam 3 kelompok perlakuan: kelompok pertama yaitu kelompok perlakuan kontrol yang diimunisasi dengan PBS; kelompok kedua diimunisasi dengan SPTAg; kelompok ketiga diimunisasi dengan SPTAg dan ajuvan CT. Imunisasi dilakukan satu kali pada awal minggu pertama. Sampel dari *flushing* mukosa usus diambil setiap minggu sampai dengan minggu keempat setelah imunisasi. Titer Ig A berupa *Optical Density (OD)* diukur dengan teknik ELISA. Data dianalisis dengan uji anava faktorial dan uji LSD (*Least Significant Different*).

Hasil penelitian menunjukkan bahwa pada pemberian SPTAg intranasal dengan atau tanpa ajuvan CT terdapat perbedaan gambaran respon imun IgA yang signifikan ( $p < 0,05$ ), dibandingkan PBS sebagai kelompok kontrol. Penggunaan SPTAg tanpa ajuvan meningkatkan respon imun yang nyata terutama pada minggu I sebesar 0,669, yang kemudian menurun pada minggu-minggu selanjutnya. Hal tersebut kemungkinan karena degradasi SPTAg oleh flora normal usus. Sedangkan penggunaan SPTAg dengan ajuvan CT, menghasilkan respon imun yang rendah pada minggu I yaitu 0,386 tetapi diikuti peningkatan yang signifikan ( $p < 0,05$ ), pada minggu III (0,632), yang merupakan puncak respon IgA tertinggi, kemudian menurun secara tidak signifikan ( $p > 0,05$ ) pada minggu berikutnya yaitu 0,551. Penggunaan SPTAg dengan ajuvan CT dapat mempertahankan respon IgA mukosa usus lebih lama karena toksin dalam ajuvan



CT dapat mengurangi degradasi flora usus dan adanya *switching* IgA pada mukosa usus yang relatif lebih tinggi dibandingkan dalam serum. Jadi, penggunaan SPTAg dengan ajuvan CT pada aplikasi intranasal mampu menginduksi peningkatan dan perubahan profil respon imun yang lebih baik dibandingkan SPTAg tanpa ajuvan CT.



## SUMMARY

### The Increase of Immunoglobulin A Titer in Mice (*Mus musculus*) after The Immunization of Soluble Protein of *Toxoplasma gondii* with or without Cholera Toxin Adjuvant Intranasally

Mona Zubaidah

In the natural pathogenesis of toxoplasmosis, the mucosa of intestinal tract is the first entry port of this parasitic infection. Therefore, local humoral immune response against this disease occurs at mucosal surface of intestinal tract, particularly accomplished by immunoglobulin A (IgA).

The use of Soluble protein (SPTAg) was aimed to induce immune response, in which the intranasal application is one of the effective immunization routes. CT adjuvant is used to restore and increase the capability of mucosal immune system to respond the immunization with SPTAg. The general objective of this study was to disclose the profile and difference of mucosal IgA immune response in experimental animals after immunization with *T. gondii* SPTAg intranasally with or without CT adjuvant.

This study was an experimental study designed using factorial 3x4 post test only design. Fourty eight mice were divided into 3 groups: First group, was the control group, immunized with PBS (*Phosphate Buffer Saline*); second group was immunized with SPTAg; third group was immunized with SPTAg and CT adjuvant. Immunization was done once at the beginning of the course of this study. Samples of flushing intestinal mucosa, were collected every week up to week four post immunization. The titration of IgA was performed using ELISA method. Data were analyzed using factorial ANOVA test and LSD (Least Significant Different) test.

Result showed, that IgA immune respons with SPTAg and SPTAg with CT adjuvant different significantly ( $p < 0,05$ ) from that of mice immunized with PBS as a control group. The use of SPTAg without adjuvant increased Ig A significantly, particularly during week 1 (0,669), and decreased during the subsequent week, due to the degradation of SPTAg by intestinal normal flora. In mice immunized with SPTAg and CT adjuvant showed, that Ig A response was low at week 1 (0,386), but then was followed with significant increase ( $p < 0,05$ ) and reached the peak of IgA response at week 3 (0,632). Subsequently, it reduced and became insignificant ( $p > 0,05$ ) up to week 4 (0,551). Immunization with SPTAg and CT adjuvant was able to maintain IgA response of intestinal mucosa longer than that of immunization without CT adjuvant, probably CT adjuvant could reduce the degradation of intestinal flora, and because IgA switching relative higher in intestinal mucosa than in serum. Conclusively, the immunization with SPTAg and CT adjuvant intranasally was able to induce the increase and change the profile of IgA in mice intestinal mucosa better than SPTAg only.

## ABSTRACT

### **The Increase of Immunoglobulin A Titer in Mice (*Mus musculus*) after The Immunization of Soluble Protein of *Toxoplasma gondii* with or without Cholera Toxin Adjuvant Intranasally**

Mona Zubaidah

This study was conducted to investigate the difference effect of intranasal immunization of *Toxoplasma gondii* SPTAg with or without CT adjuvant on IgA intestinal mucosa level. This experimental study was also to find out the interaction effect between combined group of treatment and time of flushing intestinal mucosa collection that influenced IgA intestinal mucosa level. This study was an experimental study designed using factorial 3x4 post test only design. Fourty eight mice were divided into 3 groups: First group was the control group, immunized with PBS (*Phosphate Buffer Saline*), second group immunized with SPTAg; third group was immunized with SPTAg and CT adjuvant. Immunization was done once at the beginning of the course of this study. Samples of flushing intestinal mucosa, were collected every week up to week four post immunization. The titration of IgA was performed using ELISA method. Data were analyzed using factorial ANOVA test and LSD test. The use of SPTAg without adjuvant increased Ig A significantly, particularly during week 1 (0,669), and decreased during the subsequent week, because degradation of SPTAg by intestinal normal flora. In mice immunized with SPTAg and CT adjuvant showed, that Ig A response was low at week 1 (0,386), but then was followed with significant increase and reached the peak of IgA response at week 3 (0,632). Subsequently, it reduced and became insignificant ( $p>0,05$ ) up to week 4 (0,551). The result showed that immunization with SPTAg and CT adjuvant was able to maintain IgA response of intestinal mucosa longer than that of immunization without CT adjuvant, probably CT adjuvant could reduce the degradation of intestinal flora, and because IgA switching relative higher in intestinal mucosa than in serum. Conclusively, the immunization with SPTAg and CT adjuvant intranasally was able to induce the increase and change of immune response profile better than SPTAg only.

Keywords : *T. gondii* SPTAg-CT adjuvant – intranasally–IgA



## DAFTAR ISI

	Halaman
Sampul Depan .....	i
Sampul Dalam .....	ii
Prasyarat Gelar .....	iii
Persetujuan .....	iv
Penetapan Panitia .....	v
Ucapan terima kasih .....	vi
Ringkasan .....	vii
Summary .....	ix
Abstrak.....	x
DAFTAR ISI .....	xii
DAFTAR TABEL .....	xiii
DAFTAR GAMBAR .....	xiv
DAFTAR SINGKATAN .....	xv
<b>BAB 1 PENDAHULUAN.....</b>	<b>1</b>
1.1 Latar Belakang .....	1
1.2 Rumusan Masalah .....	5
1.3 Tujuan Penelitian.....	6
1.3.1 Tujuan Umum .....	6
1.3.2 Tujuan Khusus .....	6
1.4 Manfaat Penelitian.....	7
1.4.1 Manfaat Akademik .....	7
1.4.2 Manfaat Terapan .....	7
<b>BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA.....</b>	<b>8</b>
2.1 Morfologi dan Siklus Hidup <i>T. gondii</i> .....	8
2.2 Cara penularan Toksoplasmosis .....	12
2.3 Patogenesis Toksoplasmosis pada Manusia .....	14
2.4 Respon Imun Humoral terhadap Toksoplasmosis .....	17
2.5 Respon Imun Humoral pada Mukosa Usus .....	18
2.6 Antigen dari <i>T. gondii</i> .....	20
2.6.1 Antigen permukaan <i>T. gondii</i> .....	20
2.6.2 Antigen dari mikronema(MiC) dan rhoptri (ROP) .....	21
2.6.3 Antigen beredar dari granula padat (GRA) .....	22
2.7 Protein Solubel (SPTAg) sebagai Imunogen .....	23
2.8 Ajuvan CT .....	24
<b>BAB 3 KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN</b>	<b>27</b>
3.1 Kerangka Konseptual Penelitian .....	27
3.2 Hipotesis Penelitian .....	31
<b>BAB 4 METODA PENELITIAN.....</b>	<b>32</b>
4.1 Rancangan Penelitian.....	32
4.2 Populasi, Sampel, Besar sampel dan Teknik Pengambilan sampel .....	33
4.3 Variabel Penelitian .....	34

4.3.1	Variabel bebas .....	34
4.3.2	Variabel tergantung .....	34
4.3.3	Definisi operasional variable .....	34
4.4	Bahan Penelitian .....	35
4.5	Instrumen Penelitian .....	35
4.8	Lokasi dan Waktu Penelitian .....	36
4.7	Prosedur Penelitian .....	36
4.7.1	Tahap isolasi antigen .....	36
4.7.2	Imunisasi .....	41
4.7.3	Pengambilan cairan mukosa ( <i>Flushing</i> ) .....	41
4.7.4	Prosedur ELISA .....	41
4.9	Cara pengolahan dan analisis data .....	41
BAB 5	ANALISIS HASIL PENELITIAN .....	43
5.1	Hasil Penelitian .....	43
5.2	Analisis Hasil Penelitian .....	45
5.2.1	Analisis statistik <i>One Sample Kolmogorov Smirnov Test</i> ...	45
5.2.2	Analisis Anava faktorial .....	46
5.2.3	analisis Uji Lanjut dengan Beda Nyata Terkecil ( <i>Least Significant Different</i> ) .....	47
5.2.3.1	Waktu pengamatan (minggu) .....	47
5.2.3.2	Perlakuan .....	49
5.2.3.3	Interaksi waktu pengamatan dan perlakuan .....	50
BAB 6	PEMBAHASAN .....	52
BAB 7	PENUTUP .....	58
7.1	Kesimpulan .....	58
7.2	Saran .....	58
DAFTAR PUSTAKA	.....	59
LAMPIRAN	.....	65

## DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 4.1 Jadwal imunisasi dan pengambilan cairan <i>flushing</i> .....	40
Tabel 5.1 Nilai OD pada tiap perlakuan dan tiap ulangan.....	43
Tabel 5.2 Hasil analisis <i>Kolmogorov Smirnov Test</i> .....	46
Tabel 5.3 Analisis Anava Faktorial .....	47
Tabel 5.4 Hasil uji <i>LSD</i> untuk waktu pengamatan .....	48
Tabel 5.5 Hasil uji regresi untuk waktu pengamatan pada perlakuan SPTAg .....	48
Tabel 5.6 Hasil uji regresi untuk waktu pengamatan pada perlakuan SPTAg+CT .....	48
Tabel 5.7 Hasil Uji <i>LSD</i> untuk perlakuan .....	50
Tabel 5.8 Hasil Uji <i>LSD</i> terhadap waktu pengamatan dan perlakuan..	51

## DAFTAR GAMBAR

		halaman
Gambar 2.1	Takizoit <i>Toxoplasma gondii</i> .....	9
Gambar 2.2	Kista jaringan otak .....	10
Gambar 2.3	Siklus hidup <i>T. gondii</i> .....	12
Gambar 2.4	Cara penularan <i>T. gondii</i> .....	14
Gambar 3.1	Skema respon IgA pada imunisasi dengan SPTAg tanpa ajuvan CT .....	29
Gambar 3.2	Skema respon IgA pada imunisasi dengan SPTAg dan ajuvan CT .....	30
Gambar 3.2	Skema respon IgA oleh SPTAg dan Ajuvan CT intranasal.	31
Gambar 4.1	Skema rancangan penelitian .....	32
Gambar 4.2	Skema prosedur penelitian .....	42
Gambar 5.1	Gambaran respon imun IgA pada tiap perlakuan berdasarkan rata-rata nilai OD .....	44
Gambar 5.2	Gambaran respon imun IgA pada tiap perlakuan berdasarkan rata-rata nilai OD .....	45
Gambar 5.3	Hasil gambaran kurva uji regresi waktu pengamatan pada Perlakuan dengan menggunakan SPTAg .....	49
Gambar 5.4	Hasil gambaran kurva uji regresi waktu pengamatan pada perlakuan dengan menggunakan SPTAg +CT.....	49

## DAFTAR SINGKATAN

ADCC	: Antigen Dependent Cell Cytotoxicity
APC	: Antigen Presenting Cell
CT	: Cholerae Toxin
Ct A/B	: Cholerae Toxin Subunit A/B
ELISA	: Enzyme Linked Immunosorbent Assay
ESA	: Excreted-secreted Antigen
FCA	: Freud Complete Adjuvant
FcR	: Receptor for Immunoglobulin Fragment
GRA	: Dense Granule Antigen
IEL	: Intraepithelial lymphocyte
IgA	: Immunoglobulin A
IgG	: Immunoglobulin G
IgM	: Immunoglobulin M
IL	: Interleukin
LT	: Heat Labile Toksin
MHC	: Major Histocompatibility Complex
MIC	: Micronema
NK	: Natural Killer
OD	: Optical Density
PBS	: Phospat Buffered Saline
PEF	: Penetration Enhancing Factor
ROP	: Rhoptries Antigen
SAG	: Surface Antigen
SPTAg	: Solubel Protein Antigen
Th	: T helper

## BAB 1

### PENDAHULUAN

#### 1.1 Latar Belakang Masalah

Toksoplasmosis adalah penyakit yang disebabkan oleh *Toxoplasma gondii*. Penyakit ini merupakan penyakit zoonosis yang dapat ditularkan dari binatang kepada manusia. Sumber infeksi utama adalah kucing, meskipun berbagai jenis unggas dan mamalia lainnya termasuk manusia yang berperan sebagai hospes perantara, dapat pula menjadi sumber infeksi sehingga penyakit ini dapat tersebar luas di seluruh dunia (Soedarto, 1995; Gandahusada, 2000). Dampak negatif yang ditimbulkan akibat toksoplasmosis dari segi kesehatan cukup banyak. Parasit ini menimbulkan masalah yang cukup serius khususnya bagi ibu hamil, anak-anak ataupun penderita *immunocompromise*. Prevalensi toksoplasmosis kongenital di beberapa negara diperkirakan sebagai berikut : Belanda 6,5 dari 1000 kelahiran hidup, Amerika 1,3% dan Paris 6-7%. Di Indonesia prevalensi zat anti *T.gondii* yang positif pada manusia berkisar antara 2%-63%. Sedangkan pada binatang di Indonesia, prevalensi zat anti *T. gondii* sebagai berikut : pada kucing 35%-73%, babi 11-36%, kambing 11-61%, anjing 75% dan pada ternak lain kurang dari 10% (Gandahusada, 2000).

Pada manusia, terutama wanita hamil yang mengalami toksoplasmosis akan dapat menularkan *T. gondii* kepada janin yang dikandungnya. Penularan tersebut terjadi karena *T. gondii* yang berada dalam sistem sirkulasi mampu menembus barrier plasenta dan menyebar ke seluruh jaringan atau organ dari janin (Darcy and Santoro, 1994; Robert and Janovy, 2000). Toksoplasmosis kongenital

akibat penularan fetomaternal dapat disebabkan oleh adanya infeksi primer, reinfeksi maupun reaktivasi kista *T. gondii* pada ibu yang sedang hamil (Holliman, 1996; Haumont *et al*, 2000). Pengaruh pada janin karena transmisi *T. gondii* fetomaternal akan mengakibatkan beberapa efek patologis misalnya keguguran janin, *still birth* (bayi lahir tetapi telah mati), lahir dengan berbagai kondisi patologis atau cacat seperti kalsifikasi serebralis, hidrosefalus, retardasi mental dan retinokhoroiditis (Levine, 1995; Holliman, 1996; Smith, 1999; Haumont *et al*, 2000).

Respon imun yang timbul pada tubuh akibat infeksi *T. gondii* berupa respon imun humoral dan seluler baik sistemik maupun lokal. Respon imun humoral terhadap toksoplasmosis yang bersifat lokal terutama terjadi pada permukaan mukosa saluran usus, karena pada patogenesis toksoplasmosis secara alamiah, mukosa saluran usus sebagai tempat awal masuknya infeksi parasit ini. Sehingga respon imun humoral yang terutama diperankan oleh Imunoglobulin A sekretorik (*secretory IgA*, sIgA) sangat penting peranannya sebagai pertahanan lokal mukosa usus terhadap *T.gondii* (Brandtzaeg, 1994; Underdown and Mestecky, 1994).

Perkembangan penatalaksanaan toksoplasmosis sekarang ini adalah dengan upaya diagnosis dini dan preventif melalui pengembangan kandidat vaksin untuk imunisasi yang aman dan efektif. Namun, sampai saat ini masih belum ditemukan vaksin yang aman dan efektif untuk *T. gondii*. Vaksin dianggap aman bila tidak terjadi reaktivasi virulensi bahan vaksin dalam tubuh individu yang divaksin maupun dampak negatif lain. Efektivitas vaksin didasarkan pada kemampuannya menstimulasi respon imun adaptif spesifik. Dari beberapa

imunogen yang menjadi fokus sebagai kandidat vaksin untuk toksoplasmosis adalah antigen permukaan takizoit (*Surface antigen*, SAG), antigen dari granula padat (*Dense Granule*, GRA), antigen dari mikronema (MIC) dan antigen rhoptri (ROP) dari *T. gondii* (McLeod *et al*, 1991; Darcy and Santoro, 1994; Debard *et al*, 1996; Fischer *et al*, 1996; Fischer *et al*, 1998; Jacobs *et al*, 1999; Haumont *et al*, 2000; Prigione *et al*, 2000; Velge - Roussel *et al*, 2000; Vercammen *et al*, 2000). Protein solubel (*Soluble Protein Antigen*, SPTAg) dari *T. gondii* terdiri atas antigen SAG, ROP, GRA dan MIC yang diisolasi secara bersama-sama dari *T. gondii* (Cesbron-Delauw, 2001). Protein solubel dapat menginduksi antibodi anti SAG1 dan anti SAG2 pada mencit CBA/J. Protein solubel banyak mengandung antigen baik GRA, ROP, MIC maupun SAG maka penggunaannya dapat memacu respon imun terhadap *Toxoplasma gondii* secara lengkap terhadap berbagai antigen toksoplasma. Antibodi anti GRA, anti ROP, anti MIC dan anti SAG secara integratif diharapkan akan menyebabkan hambatan pada proses penetrasi takizoit pada sel (Bourguin *et al*, 1998).

Efektifitas vaksin juga ditentukan oleh aplikasi vaksinasi antigen yang dilakukan. Sebagian besar vaksin diberikan secara parenteral dengan tujuan menstimulasi respon imun sistemik yang terbukti efektif untuk mengendalikan toksoplasmosis, padahal infeksi *T. gondii* secara alamiah adalah melalui saluran cerna dan pada infeksi tersebut terutama menginduksi respon imun lokal (mukosa usus). Aplikasi yang efektif untuk membangkitkan respon imun lokal adalah melalui oral, namun lingkungan saluran cerna sangat mempengaruhi aplikasi vaksinasi bila diberikan secara oral. Salah satu alternatif aplikasi vaksinasi yang dapat membangkitkan sistem imun mukosa adalah melalui rute intranasal (Debard



*et al*, 1996; Roussel *et al*, 1999). Aktivasi sistem imun melalui aplikasi intranasal dapat terjadi karena pada mukosa rongga hidung muncit ditemukan komponen sistem imun seperti limfosit T, limfosit B, sel M, makrofag dan sel dendrit (Sminia and Kraal, 1999). Munculnya respon imun secara sistemik ataupun lokal seperti pada mukosa usus karena sel dendrit maupun limfosit pada lokasi induksi (mukosa hidung) teraktivasi dan bermigrasi ke dalam sistem sirkulasi melalui kelenjar limfe servikalis posterior dan limpa. Sebagian limfosit juga bermigrasi ke jaringan mukosa saluran usus (Bonenfant *et al*, 2001). Pada lokasi target tersebut, sel Th (*T helper*) akan mengaktivasi limfosit B untuk menghasilkan IgA sebagai respon terhadap antigen (Sminia and Kraal, 1999).

Peluang terjadinya degradasi antigen dan jumlah yang diperlukan untuk induksi sistem imun pada aplikasi intranasal relatif lebih kecil dibanding dengan rute intramuskular ataupun oral (Debard *et al*, 1996). Sebagai contoh adalah penelitian Barackman *et al* (1996) menunjukkan bahwa pada aplikasi antigen hemaglutinin virus influenza secara intranasal, mampu menginduksi respon imun yang lebih tinggi dibanding melalui rute intramuskular. Namun aplikasi dengan cara ini terdapat resiko lemahnya imunogenitas antigen yang digunakan, sehingga diperlukan suatu adjuvan. Pada bidang imunologi, salah satu adjuvan mukosa yang potensial adalah adjuvan toksin kolera (*Cholera Toxin, CT*) (Debard *et al*, 1996; Douce *et al*, 1997; Rappuoli *et al*, 1999; Velge – Roussel *et al*, 2000).

Penggunaan SPTAg sebagai antigen untuk dapat menginduksi pembentukan imunoglobulin spesifik telah dilaporkan oleh Darcy and Santoro (1994), demikian pula dengan penelitian Subekti dan Arrasyid (2002) menggunakan SPTAg untuk membedakan adjuvan CT dan enterotoksin tidak tahan

panas (*heat labile toksin*, LT) pada aplikasi intranasal. Aplikasi SPTAg secara subkutan dapat memberikan proteksi terhadap infeksi *T. gondii* (Alexander *et al*, 1996). Vaksinasi melalui rute subkutan menggunakan SPTAg dari takizoit *T. gondii* galur RH dengan ajuvan interleukin (IL) 12 juga menginduksi respon imun protektif pada mencit BALB/c (Yap *et al*, 1998). Sebaliknya pada aplikasi intranasal kemampuan SPTAg dalam menginduksi respon imun spesifik belum diketahui, baik yang diberikan secara tunggal tanpa ajuvan maupun menggunakan ajuvan CT. Latar belakang tersebut menjadi dasar perlunya mempelajari perbedaan respon imun yang dihasilkan setelah imunisasi dengan SPTAg *T. gondii* dengan atau tanpa penggunaan CT sebagai ajuvan. Di sisi lain evaluasi SPTAg sebagai bahan vaksin untuk aplikasi intranasal belum diketahui efikasinya dalam menginduksi respon imun humoral terutama IgA. Di dalam penelitian ini dilakukan imunisasi dengan menggunakan SPTAg dengan dan tanpa ajuvan CT terhadap mencit BALB/c. Imunisasi dilakukan secara intranasal pada awal penelitian. Pengambilan *flushing intestinal* dilakukan setiap satu minggu satu kali sampai dengan minggu keempat. Pengukuran titer Ig A dilakukan dengan ELISA.

## 1.2 Rumusan Masalah

Mengingat bahwa:

- belum ditemukannya vaksin yang efektif untuk *T.gondii*
- belum diketahui bagaimana kemampuan SPTAg baik secara tunggal maupun dengan ajuvan CT dalam menginduksi respon imun IgA pada aplikasi intranasal

maka rumusan masalah dalam penelitian ini adalah:

- a. Apakah terdapat perbedaan respon imun mukosa usus hewan coba berupa IgA akibat pemberian SPTAg *T. gondii* dengan atau tanpa menggunakan ajuvan CT yang diaplikasikan secara intranasal?
- b. Apakah ada perbedaan di antara waktu *flushing intestinal* yang satu dengan yang lainnya terhadap titer IgA mukosa usus?
- c. Apakah ada interaksi/pengaruh antara waktu *flushing intestinal* dan pemberian SPTAg *T. gondii* dengan atau tanpa menggunakan ajuvan CT yang diaplikasikan secara intranasal terhadap titer IgA mukosa usus?

### **1.3 Tujuan Penelitian**

#### **1.3.1 Tujuan Umum**

Penelitian ini secara umum bertujuan untuk mengetahui gambaran dan perbedaan respon imun IgA mukosa usus hewan coba terhadap imunisasi SPTAg *T. gondii* yang diaplikasikan secara intranasal dengan atau tanpa menggunakan ajuvan CT.

#### **1.3.2 Tujuan Khusus**

Tujuan khusus penelitian ini adalah untuk :

- a. Membuktikan ada tidaknya perbedaan gambaran atau profil Ig A mukosa usus setelah imunisasi SPTAg *T.gondii* dengan atau tanpa menggunakan ajuvan CT yang diaplikasikan secara intranasal.
- b. Membuktikan ada tidaknya perbedaan di antara waktu *flushing intestinal* terhadap titer IgA mukosa usus.

- c. Membuktikan ada tidaknya interaksi atau pengaruh antara waktu pengamatan dan pemberian SPTAg *T.gondii* dengan atau tanpa ajuvan CT terhadap gambaran IgA mukosa usus.

#### **1.4 Manfaat Penelitian**

##### **1.4.1 Manfaat Akademik**

Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan masukan bagi perkembangan dan khazanah keilmuan pada umumnya dan teori yang berhubungan dengan toksoplasmosis khususnya gambaran respon imun Ig A mukosa usus dengan pemberian SPTAg dengan dan tanpa ajuvan CT .

##### **1.4.2 Manfaat Terapan**

Dari segi praktisi, hasil penelitian ini diharapkan dapat bermanfaat, antara lain:

- a. Sebagai dasar untuk mengembangkan kemungkinan menjadikan SPTAg *T.gondii* dengan atau tanpa ajuvan CT secara intranasal sebagai alternatif vaksin terhadap *T.gondii* .
- b. Membantu upaya pencegahan terhadap toksoplasmosis.

## BAB 2

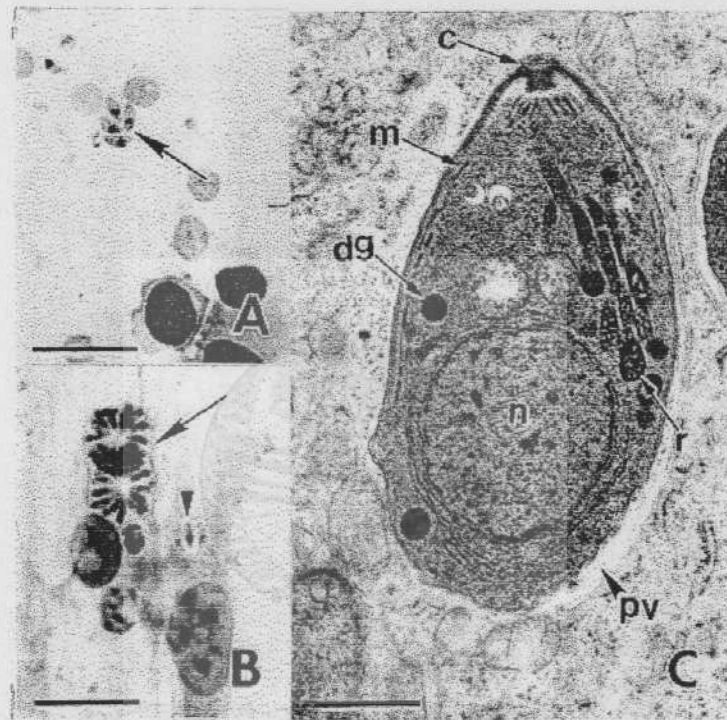
### TINJAUAN PUSTAKA

#### 2.1 Morfologi dan Siklus Hidup *T. gondii*

*T. gondii* adalah suatu *coccidia* yang mempunyai tiga bentuk perkembangan, yaitu: takizoit/tropozoit, kista dan ookista yang menghasilkan sporozoit. Di dalam hospes definitif dari *T. gondii* adalah hewan dalam famili *Felidae* khususnya kucing. *T. gondii* mengalami perkembangan aseksual (*schizogoni*) maupun seksual (*gametogoni*) yang diakhiri dengan terbentuknya ookista pada sel epitelium dari saluran usus (Darcy and Santoro, 1994; Robert and Janovy, 2000). Setiap ookista yang dikeluarkan oleh hospes definitif akan mengalami sporulasi sehingga terbentuk dua sporokista yang masing masing berisi empat sporozoit. Ookista yang telah bersporulasi tersebut merupakan salah satu stadium infeksi yang mampu bertahan dalam lingkungan luar. Bentuk ookista ini, dapat menginfeksi hospes perantara seperti burung, mamalia dan juga manusia. (Levine, 1995). Di tanah yang tercemar, ookista dapat dibawa oleh lalat, kecoak, semut atau cacing tanah ke berbagai tempat di kebun. Ookista dapat menempel pada sayuran, buah-buahan atau termakan oleh hewan ternak seperti ayam, kambing, anjing, sapi, dan menembus epitel usus. Ookista berkembang biak dengan membelah diri serta menetap dalam bentuk kista pada organ hewan tersebut, seperti terlihat pada Gambar 2.3 (Bioschi, 2003).

Di berbagai jaringan tubuh kucing juga ditemukan tropozoit dan kista jaringan. Pada manusia, takizoit ditemukan pada infeksi akut dan dapat memasuki tiap sel yang berinti. Bentuk takizoit menyerupai bulan sabit dengan satu ujung

yang runcing dan ujung yang lain berbentuk agak bulat. Panjang takizoit 4 – 8  $\mu\text{m}$  dan mempunyai satu inti yang letaknya agak ditengah dan takizoit pada manusia adalah parasit obligat intraseluler. Bila sel penuh dengan takizoit maka sel menjadi pecah dan takizoit memasuki sel-sel disekitarnya atau difagosit oleh sel makrofag (Dubey, 1999). Bentuk takizoit *T. gondii* tercantum dalam Gambar 2.1.

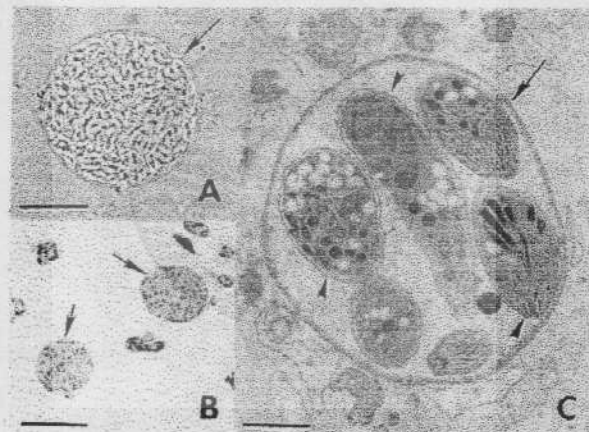


Gambar 2.1 Takizoit *T.gondii* (Dubey, 1999)

- A. Bentuk ekstraseluler, terlepas dari hospes (garis = 20  $\mu\text{m}$ )
- B. Bentuk intraseluler pada kultur sel, bentuk *rosette* (seperti bunga mawar) (garis = 20  $\mu\text{m}$ )
- C. Gambaran takizoit intraseluler dengan mikroskop elektron (C=Conoid, m=micronemes, dg=dense granules, n=nucleus dan r= *rhoptri*) (garis = 0,8  $\mu\text{m}$ )

Kista jaringan dibentuk di dalam sel hospes bila takizoit yang membelah telah membentuk dinding. Kista terbentuk dalam hospes dengan ukuran yang bervariasi, dari kista yang mengandung hanya beberapa organisme sampai

berukuran 200  $\mu\text{m}$  berisi 3.000 organisme (Bioschi, 2003). Dinding kista akan dihancurkan oleh tripsin atau pepsin dan parasit yang bebas dari kista dapat bertahan terhadap asam klorida dan tripsin masing-masing selama 2 – 6 jam. Hal ini menyebabkan parasit bertahan dalam periode digestif normal di lambung dan dapat bertahan lama dalam duodenum (Levine, 1995). Kista jaringan ini dapat ditemukan di dalam hospes seumur hidup terutama di otak, otot jantung dan otot bergaris. Di otak kista berbentuk lonjong dan bulat sedang di otot kista mengikuti bentuk sel otot (Bioschi, 2003). Gambaran kista jaringan otak tercantum dalam Gambar 2.2



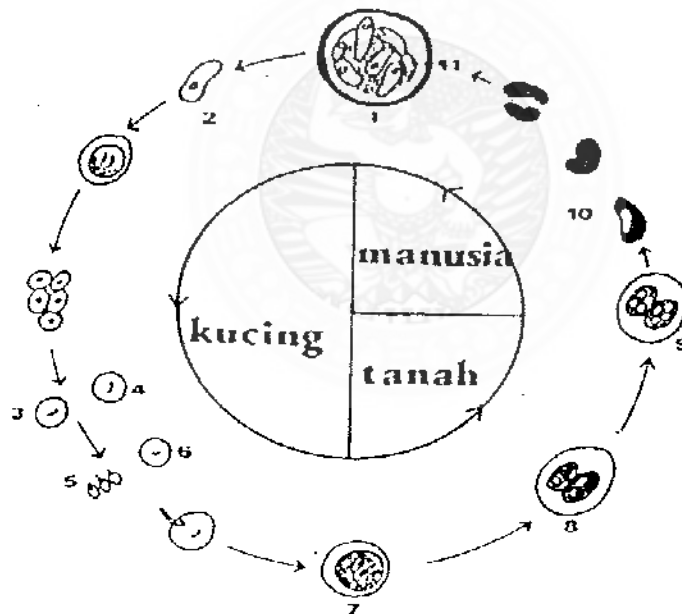
Gambar 2.2 Kista jaringan otak (Dubey, 1999)

- A. Kista jaringan dari otak tikus (garis = 20  $\mu\text{m}$ )
- B. Dua kista jaringan dari irisan otak (garis = 20  $\mu\text{m}$ )
- C. Gambaran mikroskop elektron dari kista jaringan yang berisi 6 bradizoit (garis = 1,0  $\mu\text{m}$ ).

Tertelannya ookista yang telah bersporulasi oleh hospes perantara akan mengakibatkan terjadinya ekskistasi. Ekskistasi merupakan proses terlepasnya sporozoit dari ookista karena efek mekanik dan enzimatik di dalam saluran pencernaan hospes. Di dalam hospes perantara, *T. gondii* hanya mengalami

perkembangan aseksual dengan dua bentuk parasit yang berbeda. Masing masing adalah bentuk takizoit (*tachyzoite*) dan kista bradizoit (*bradyzoite*). Sporozoit yang keluar dari ookista akan menginfeksi sel epitel usus dan disebut takizoit. Selanjutnya takizoit akan dapat menyebar baik dalam organ pencernaan (saluran usus) maupun berbagai organ lain di seluruh tubuh melalui pembuluh limfe maupun pembuluh darah (Robert and Janovy, 2000)

Takizoit merupakan bentuk multiplikatif aktif dan cepat yang berkaitan dengan manifestasi klinis toksoplasmosis akut. Bradizoit merupakan stadium multiplikatif lambat dan non invasif dengan membentuk kista yang berkaitan dengan infeksi kronis (Darcy and Santoro, 1994 ; Robert and Janovy, 2000).



Gambar 2.3 Siklus hidup *T. gondii* (Soedarto,1995)

- 1.Kista 2.Trofozoit 3. Mikrogametosit 4. Makrogametosit 5. Mikrogamet
6. Makrogamet 7. Ookista 8. Sporokista 9. Sporozoit 10. Trofozoit
11. Bradizoit



## 2. 2 Cara Penularan Toksoplasmosis

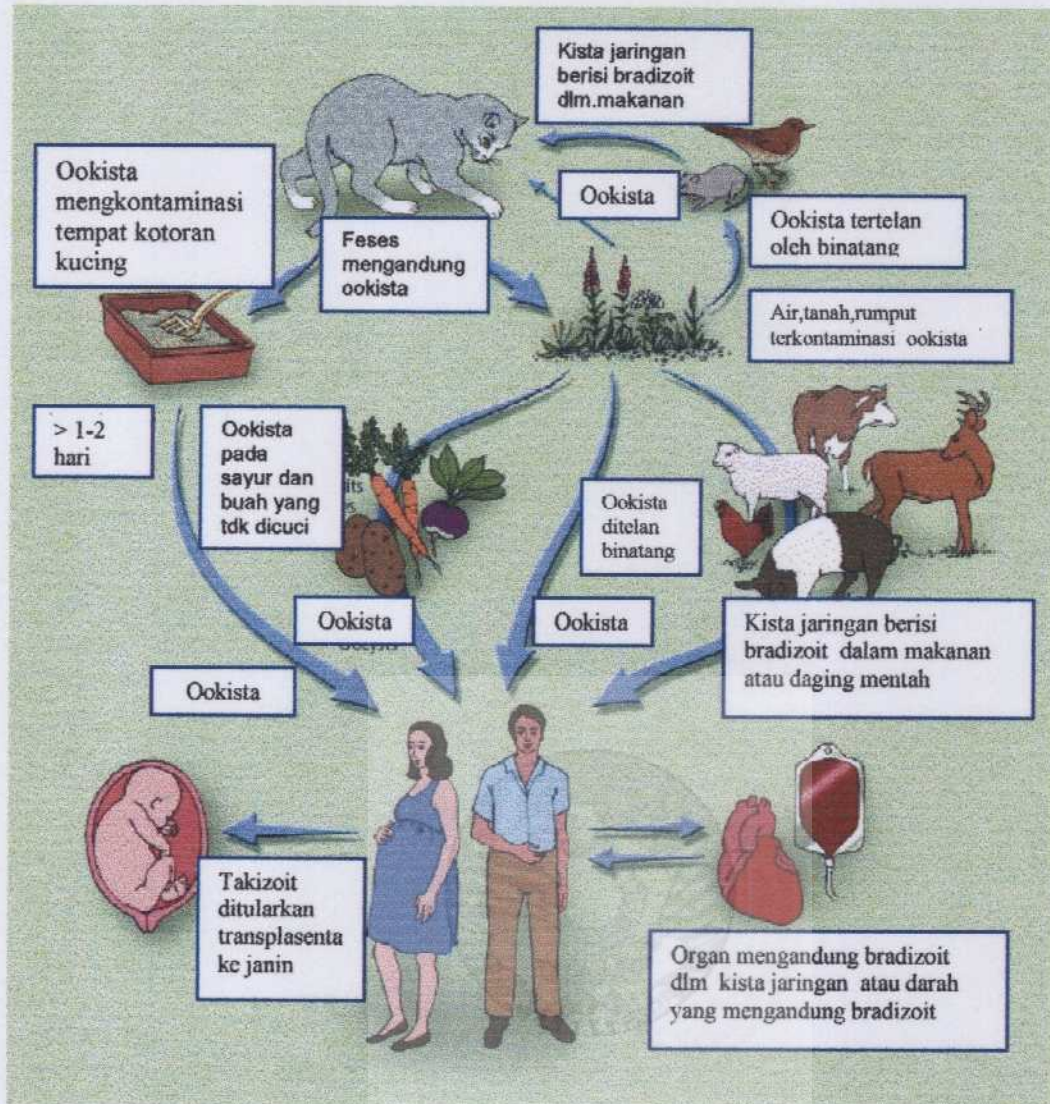
Penularan toksoplasmosis dari hospes definitif kepada hospes perantara dapat terjadi dengan berbagai cara tergantung jenis hospes perantaranya. Pada manusia infeksi oleh *T. gondii* dapat terjadi dengan dua cara. Pertama dengan tertelannya ookista infeksiif melalui makanan yang terkontaminasi misalnya sayur atau buah buahan. Ookista infeksiif tersebut selanjutnya mengalami ekskistasi dan takizoit akan menyebar ke seluruh jaringan atau organ serta mengalami multiplikasi tipe cepat dan secara aktif akan menginvasi sel pada jaringan atau organ lainnya (Darcy and Santoro, 1994; Dubey *et al*, 1998; Robert and Janovy, 2000).

Bentuk penularan kedua terjadi karena tertelannya kista yang berisi bradizoit dalam daging hewan. Bradizoit akan menginfeksi sel epitel usus dan berubah menjadi takizoit atau tetap dalam bentuk bradizoit tergantung status imun hospes perantara. Bentuk bradizoit akan mengalami multiplikasi yang sangat lambat dan akan kembali membentuk kista dalam jaringan atau organ individu yang terinfeksi. Pada status imun yang lemah bradizoit akan berubah menjadi takizoit dan akan mengalami multiplikasi cepat dan invasi aktif. Takizoit mampu menginfeksi semua jenis sel yang berinti termasuk makrofag (Darcy and Santoro, 1994).

Pada toksoplasmosis kongenital, janin secara transplasental mendapatkan penularan dari ibu yang menderita toksoplasmosis, yang sering kali sebagai sumber penularan tapi tidak menunjukkan gejala-gejala yang jelas (Gambar 2.4). Bila penularan terjadi pada bulan-bulan awal kehamilan, maka dapat terjadi

keguguran (abortus) atau anak lahir mati. Jika infeksi dengan parasit ini terjadi pada bulan-bulan akhir kehamilan maka selama berada dalam kandungan, bayi tidak menunjukkan kelainan, tetapi 2 sampai 3 bulan sesudah dilahirkan gejala-gejala klinik pada bayi baru terlihat. Selain melalui plasenta, penularan toksoplasmosis dari ibu kepada anak dapat terjadi melalui air susu ibu apabila ibu ketularan toksoplasmosis pada masa nifas (Soedarto, 1995).

Toksoplasmosis dapat merupakan infeksi toksoplasmosis yang dapat terjadi baik pada anak-anak maupun orang dewasa. Penularan dengan parasit ini dapat terjadi melalui berbagai jalan; yaitu melalui makanan, melalui udara atau melalui kulit. Infeksi dapat terjadi melalui makanan yang tercemar atau mengandung pseudokista yang infeksiif, misalnya melalui daging yang kurang matang memasaknya, melalui susu sapi atau melalui telur unggas. Penderita toksoplasmosis dapat tertular melalui udara (*droplet infection*) dari penderita *pneumonitis toxoplasmosis*. Selain itu penularan melalui kulit dapat pula terjadi apabila terjadi kontak manusia dengan jaringan atau eksreta binatang yang sedang menderita toksoplasmosis (Soedarto, 1995). Infeksi juga dapat terjadi melalui transfusi darah atau transplantasi organ dari donor yang menderita toksoplasmosis (Gandahusada, 2000).



Gambar 2.4 Cara Penularan *T. gondii* (Jones et al, 2001)

### 2.3 Patogenesis Toksoplasmosis pada Manusia

*T. gondii* merupakan suatu parasit intraselular dan reproduksi terjadi di dalam sel. Kebanyakan kasus toksoplasmosis pada manusia didapat karena mengkonsumsi jaringan yang mengandung kista yang ada pada daging yang proses pemasakannya kurang sempurna atau daging mentah. Selain itu kontak langsung dengan tanah atau air yang terkontaminasi oleh feces kucing yang

mengandung ookista yang secara tidak langsung kontak dengan makanan atau minuman (Dubey, 1999).

Takizoit yang telah menginfeksi sel, hidup dalam suatu vakuola parasitoforus (*parasitophorus vacuole*) yang mengalami modifikasi sehingga tidak dapat fusi dengan kompartemen intrasel lainnya (misalnya lisosom) menyebabkan parasit mampu bertahan hidup untuk jangka waktu lama didalam sel dan sewaktu waktu dapat reaktivasi (McLeod *et al*, 1991; Holliman, 1996; Robert and Janovy, 2000).

Jalur yang digunakan untuk invasi oleh takizoit setelah melewati sel epitel usus adalah melalui kelenjar limfe menuju limfonodi mesenterika dan pembuluh darah menuju parenkim hepar (Susanto *et al*, 1999; Robert and Janovy, 2000). Jalur tersebut akan dipergunakan oleh takizoit untuk menyebar lebih jauh ke berbagai organ atau jaringan terutama otot jantung, retina mata dan otak. Pada ketiga organ tersebut parasit dapat hidup dan berkembang relatif lama sebagai bradizoit yang akan mengakibatkan kerusakan atau gangguan fungsi jaringan maupun organ (Dubey *et al*, 1998; Robert and Janovy, 2000). Sebelum organ lain menjadi rusak, nekrosis akan terjadi lebih dahulu pada usus dan limfonodi mesenterika, baru kemudian terjadi nekrosis terjadi pada organ lain. Gambaran klinis akan tampak segera setelah beberapa waktu jaringan mengalami kerusakan khususnya organ mata, jantung, dan kelenjar adrenal. Kejadian nekrosis pada organ-organ tersebut diakibatkan oleh adanya multiplikasi intraselular dari takizoit (Dubey, 1999).

Bradizoit yang membentuk kista dalam jaringan akan mampu mengalami reaktivasi menjadi bentuk takizoit apabila kondisi memungkinkan. Perubahan

dari takizoit menjadi bradizoit atau sebaliknya dipengaruhi oleh status imun individu (Darcy and Santoro, 1994; Denkers and Gazzinelli, 1998; Susanto *et al*, 1999). Pada saat respon imun individu optimal maka takizoit akan segera mengalami eliminasi ataupun berubah menjadi bradizoit. Reaktivasi dapat terjadi apabila sistem imun individu menjadi lemah yang dapat diakibatkan karena menurunnya titer imunoglobulin yang spesifik (Darcy and Santoro, 1994; Denkers and Gazzinelli, 1998; Susanto *et al*, 1999).

Terjadinya infeksi primer, reinfeksi maupun reaktivasi berimplikasi adanya takizoit dalam sistem sirkulasi dan menyebar ke sel atau jaringan lain. Keadaan tersebut tersebut disebabkan kemampuan takizoit untuk menembus barrier plasenta dan dapat terjadi infeksi fetomaternal sehingga sangat rawan untuk ibu hamil (Darcy and Santoro, 1994; Robert and Janovy, 2000). Infeksi fetomaternal pada janin akan mengakibatkan beragam manifestasi klinis seperti aborsi spontan, *still birth*, hidrosefalus, kalsifikasi intraserebral, retinakhoroiditis maupun retardasi mental (Holliman, 1996; Smith, 1999; Haumont *et al*, 2000; Robert and Janovy, 2000). Sebaliknya manifestasi klinis dari toksoplasmosis pada individu dewasa umumnya asimtomatis meskipun dapat pula simtomatis non spesifik (Robert and Janovy, 2000). Gejala klinis toksoplasmosis pada individu dewasa tersebut berupa nyeri serta pembengkakan limfonodi servikalis dan inguinalis, sakit kepala, demam, nyeri otot dan anemia (Holliman, 1996; Robert and Janovy, 2000).

## 2.4 Respon Imun Humoral terhadap Toksoplasmosis

Respon imun yang muncul terhadap infeksi *T. gondii* pada manusia berupa respon imun seluler dan humoral, Respon imun tersebut dapat terjadi pada sistem sirkulasi (sistemik) maupun permukaan mukosa (mukosal) khususnya pada permukaan saluran usus (Kasper and Buzoni – Gatel, 2001). Kedua tipe respon imun tersebut secara sinergis memberikan proteksi atau perlindungan pada setiap individu yang normal.

Keberadaan respon imun humoral sangat esensial dalam memberikan perlindungan pada hospes. Kepentingan respon imun humoral tersebut berkaitan dengan bentuk takizoit ekstraseluler yang aktif dan invasif dalam sistem sirkulasi. Respon imun humoral juga terjadi pada permukaan mukosa seperti pada saluran usus. Pada sistem sirkulasi yang berperan utama adalah Immunoglobulin M (IgM) dan immunoglobulin G (IgG), sedangkan pada permukaan mukosa yang lebih dominan berperan yaitu IgA (Darcy and Santoro, 1994). Tanda munculnya respon imun humoral adalah terbentuknya IgM pada fase awal infeksi dan bertahan dalam waktu yang relatif singkat, selanjutnya terjadi *switching* menjadi kelas immunoglobulin yang lain seperti IgG dan IgA (Abbas *et al*, 2000).

Debard *et al* (1996) menyatakan bahwa respon IgG maupun IgA mengalami peningkatan setelah dilakukan vaksinasi intranasal pada mencit CBA/J dengan menggunakan antigen permukaan *T. gondii*. Peningkatan titer IgG maupun IgA tersebut ternyata mampu meningkatkan resistensi mencit terhadap infeksi *T. gondii* secara *in vivo*. Laporan yang dikemukakan oleh Sayles *et al* (2000) membuktikan secara tidak langsung akan kepentingan respon imun

humoral. Pada mencit BALB/c yang mengalami defisiensi limfosit B ternyata sangat peka terhadap infeksi *T. gondii*.

McLeod *et al* (1991) menyatakan, apabila takizoit yang berikatan dengan antibodi (membentuk kompleks antigen-antibodi) kemudian masuk atau difagositosis melalui perantara reseptor Fc (FcR) maka vakuola parasitoforus akan mengalami fusi dengan lisosom. Fusi antara vakuola intraseluler tersebut mengakibatkan destruksi takizoit dalam sel. Destruksi *T. gondii* juga dapat terjadi dalam sirkulasi dengan bantuan komplemen, sel fagositik maupun sel sitotoksik (Darcy *and* Santoro, 1994). Sebaliknya apabila takizoit dapat masuk ke dalam sel secara aktif melalui reseptor selain FcR maka vakuola parasitoforus tidak dapat mengalami fusi dengan lisosom sehingga tetap dapat hidup dalam sel tersebut (McLeod *et al*, 1991). Sel penyaji antigen (*Antigen Presenting Cells*, APC) seperti sel dendrit, makrofag maupun limfosit B secara umum juga teraktivasi oleh takizoit. Aktivasi tersebut mengakibatkan teraktivasinya sel Th, baik Th<sub>1</sub> maupun Th<sub>2</sub> (Denkers *and* Gazzinelli, 1998). Sel Th<sub>2</sub> berfungsi menstimulasi limfosit B untuk berdiferensiasi menjadi sel plasma dan menghasilkan imunoglobulin (Abbas *et al*, 2000).

## 2.5 Respon Imun Humoral pada Mukosa Usus

Respon imun mukosa terhadap toksoplasmosis terutama terjadi pada permukaan mukosa saluran usus sebagai tempat awal masuknya parasit. Efektor pada sistem imun mukosa pada permukaan saluran usus berupa respon imun humoral maupun seluler (Killian *and* Russell, 1994; Kasper *and* Buzoni – Gatel, 2001). Respon imun humoral pada permukaan mukosa usus terutama diperankan

oleh IgA (Brandtzaeg, 1994; Underdown and Mestecky, 1994). Walaupun demikian dalam jumlah sedikit ternyata IgG dan IgM yang spesifik juga ditemukan pada permukaan mukosa usus (Brandtzaeg, 1994; Underdown and Mestecky, 1994).

Dominansi IgA pada permukaan mukosa, khususnya permukaan mukosa usus terlihat dari persentase distribusi dan produksi hariannya. Distribusi topologis, pada duodenum sampai jejunum persentase IgA sebesar 79 % dan Ig M serta IgG masing masing 18 % dan 3 %. Pada ileum persentase IgA meningkat menjadi 84 % sedang IgM dan IgG masing masing sebesar 11 % dan 5 % (Brandtzaeg, 1994).

Secara umum IgA bekerja dengan mekanisme yang berbeda dibanding jenis imunoglobulin lainnya. IgA bekerja dengan cara eksklusi kompetitif terhadap organisme asing dan tidak mengaktivasi komplemen melalui jalur klasik (Killian and Russell, 1994 ), sebaliknya Abbas *et al* (2000) menyatakan bahwa IgA mampu mengaktivasi komplemen melalui jalur alternatif. Menurut Killian and Russell (1994) serta Mestecky *et al* (2001) pada permukaan mukosa saluran usus, IgA akan menghambat adesi dan penetrasi organisme ke dalam enterosit sehingga tidak dapat menginvasi lebih lanjut.

Pada permukaan mukosa saluran usus, populasi limfosit T terutama ditemukan pada limfosit intraepitelial (*intraepithelial lymphocyte*, IEL). Fenotip utama (75 – 90 %) dari limfosit intraepitelial adalah sel T/CD8<sup>+</sup> (Yun *et al*, 2000; Kasper and Buzoni – Gatel, 2001).



## 2.6 Antigen dari *T. gondii*

Imunogen merupakan semua antigen yang mampu menstimulasi timbulnya respon imun secara aktif dari suatu individu (Elgert, 1996). Definisi tersebut berbeda dengan antigen yaitu bahan asing yang masuk ke dalam tubuh individu dan tidak selalu menginduksi respon imun. McLeod *et al* (1991) menyatakan lebih dari seratus macam antigen telah dikarakterisasi dari *T. gondii*. Beberapa antigen tersebut telah diketahui dapat bertindak sebagai imunogen dan telah dicoba dalam berbagai percobaan vaksinasi.

Beberapa protein yang intensif dipelajari untuk dapat dijadikan sebagai kandidat bahan vaksin yaitu antigen permukaan (*Surface Antigen, SAG*), antigen sekretorik dari granula padat (*Dense Granule Antigen, GRA*), antigen yang disekresikan dari rhoptri (*Rhoptries antigen, ROP*) dan mikronema (*miconeme antigen, MIC*). Setiap kelompok masih memiliki beberapa jenis antigen yang lebih lanjut digolongkan menjadi subkelompok berdasar berat molekul proteinnya.

### 2.6.1 Antigen permukaan *T. gondii*

Antigen ini merupakan protein yang hanya ditemukan pada bentuk takizoit dan terdistribusi secara homogen di permukaan takizoit yang menyusun sekitar lima persen dari total protein takizoit (McLeod *et al*, 1991). Antigen permukaan ini telah diidentifikasi terdiri dari SAG1-SAG6 yang bermanfaat dalam proses perlekatan dengan sel hospes yang akan diinfeksi (Tomavo, 1996; Susanto *et al*, 1999; Black and Boothroyd, 2000). Perlekatan yang terjadi antara takizoit dengan sel hospes akan memudahkan orientasi ujung anteriornya terhadap sel hospes dan melakukan penetrasi secara aktif (Black and Boothroyd, 2000). Penggunaan

melakukan penetrasi secara aktif (Black and Boothroyd, 2000). Penggunaan SAG, terutama SAG1 sebagai kandidat bahan vaksin telah dilaporkan oleh beberapa peneliti pada berbagai sistem percobaan yang berbeda. Beberapa peneliti tersebut diantaranya adalah Debard *et al* (1996) menggunakan SAG1 secara intranasal sebagai antigen yang dapat memberikan proteksi pada imunisasi mukosa dengan ajuvan CT, Velge – Roussel *et al* (2000) juga membuktikan bahwa SAG1 dengan ajuvan CT mampu mengaktivasi beberapa sel komponen sistem imun mukosa dan penelitian Bonenfant *et al* (2001) menggunakan SAG1 dengan ajuvan enterotoksin tidak tahan panas (*Heat Labile Toxin*, LT) ternyata mampu menginduksi sistem imun humoral baik sistemik maupun mukosa.

### 2.6.2 Antigen dari mikronema (MIC) dan rhoptri (ROP)

Protein dari mikronema dan rhoptri disekresikan selama terjadinya proses penetrasi ke dalam sel dan proses awal pembentukan vakuola parasitoforus. Fungsi protein mikronema secara pasti dan detil belum seluruhnya diketahui (Fourmaux *et al*, 1996), meskipun demikian peneliti lain telah melaporkan beberapa fungsi yang berkaitan dengan proses penetrasi. Antigen MIC dan ROP dinyatakan sebagai faktor pemacu penetrasi (*Penetration Enhancing Factor*, PEF) yang membantu meningkatkan kemampuan dan kecepatan penetrasi takizoit *T. gondii* kedalam sel hospes (McLeod *et al*, 1991; Fischer *et al*, 1996; Fourmaux *et al*, 1996; Dubey *et al*, 1998; Susanto *et al*, 1999; Black and Boothroyd, 2000).

Selain sebagai PEF, ROP juga diperlukan untuk modifikasi awal proses pembentukan vakuola parasitoforus (Cesbron – Delauw *et al*, 1996; Susanto *et al*, 1999; Black and Boothroyd, 2000). Modifikasi pembentukan vakuola

parasitoforus diperlukan agar vakuola tersebut tidak mengalami asidifikasi dan fusi dengan kompartemen seluler lain seperti lisosom sehingga takizoit dapat terus melakukan penetrasi dan vakuola tetap terbentuk tanpa dirusak oleh sel hospes (Dubey *et al*, 1998; Susanto *et al*, 1999; Black and Boothroyd, 2000).

Penggunaan MIC sebagai kandidat vaksin dilaporkan oleh Channon *et al*. (1999) yang menyatakan bahwa adanya antibodi anti MIC1 atau MIC2 menyebabkan hambatan penetrasi takizoit pada kultur monosit secara *in vitro*. Menurut Vercammen *et al* (2000) ROP dapat ditemukan pada bentuk takizoit maupun bradizoit. Antigen rhoptri yang telah dicoba digunakan sebagai bahan vaksin dan mampu menstimulasi peningkatan IgG<sub>2a</sub> adalah antigen ROP2 (Vercammen *et al*, 2000). Sedangkan Fischer *et al* (1996) dan Bourguin *et al* (1998) juga menyatakan bahwa ROP2 – ROP4 dapat menginduksi munculnya respon imun adaptif pada mencit.

### 2.6.3 Antigen beredar dari granula padat (GRA)

Antigen lain yang telah dipelajari adalah antigen beredar atau antigen sekretori dan ekskretori dari organel granula padat (GRA). Sampai saat ini telah diteliti, terdapat delapan kelompok GRA (GRA1-GRA8) (Cesbron – Delauw *et al*, 1996; Black and Boothroyd, 2000). Kumpulan semua antigen GRA (dari GRA1 sampai GRA8) yang diisolasi dari takizoit *T. gondii* umumnya dikenal dengan nama antigen beredar *Excreted-Secreted Antigens* atau ESA (Cesbron-Delauw, 1996). Secara umum antigen tersebut dapat ditemukan pada bentuk takizoit, bradizoit maupun dinding sel ookista (McLeod *et al*, 1991).

Fungsi GRA secara umum adalah sebagai protein untuk modifikasi akhir dan penyempurna vakuola parasitoforus (Black and Boothroyd, 2000). Modifikasi ini diperlukan agar vakuola parasitoforus dapat menjadi tempat yang sesuai dan mendukung perkembangan takizoit maupun bradizoit selama kehidupan intraseluler. Protein antigen ini disekresikan setelah vakuola parasitoforus terbentuk atau setelah sekresi protein ROP (Black and Boothroyd, 2000).

Antigen protein GRA dapat ditemukan di bagian bawah membran luar, vakuola parasitoforus dan aparatus golgi (McLeod *et al*, 1991). Seperti halnya SAG, antigen GRA baik GRA1, GRA2, GRA4 maupun GRA7 telah dievaluasi dan dilaporkan memiliki potensi sebagai kandidat bahan vaksin. Vercammen *et al* (2000) telah melakukan pengujian komparatif antigen beredar rekombinan GRA1 dengan rekombinan GRA7 dan ROP2 sebagai kandidat vaksin melalui teknologi vaksin DNA untuk *T. gondii* secara intramuskular pada mencit BALB/c.

## 2.7 Protein Solubel (SPTAg) sebagai Imunogen

Antigen beredar atau ESA terdiri atas semua GRA yang terisolasi tanpa separasi masing masing tipenya. Antigen ESA tersebut dapat diisolasi dari takizoit *T. gondii* bersama-sama dengan protein lain seperti MIC dan ROP (ROP1 sampai ROP8) sehingga dikenal dengan nama protein solubel. Secara keseluruhan, protein solubel merupakan total protein terlarut yang dapat disekresi atau diekskresikan keluar dari takizoit *T. gondii* yang terdiri atas campuran semua GRA, ROP dan MIC (Cesbron-Delauw, 1996). Sedangkan bahan vaksin dengan menggunakan protein solubel sebagai imunogen telah dilaporkan oleh beberapa

peneliti diantaranya melalui rute aplikasi subkutan dengan ajuvan FCA, vesikel lemak maupun IL 12 (Alexander *et al*, 1996; Yap *et al*, 1998). Darcy and Santoro (1994) menyebutkan bahwa penggunaan SPTAg dapat menginduksi pembentukan imunoglobulin spesifik, demikian pula pada penelitian Subekti dan Arrasyid (2002) yang menggunakan SPTAg dengan ajuvan CT dan LT. Pada penelitian ini, imunogen yang digunakan adalah SPTAg yang diisolasi dari takizoit *T. gondii*, galur RH. Untuk cara isolasi dan dosis yang digunakan, dapat dilihat pada Metoda Penelitian (BAB 4).

## 2.8 Ajuvan CT

Ajuvan merupakan substansi yang membantu memperbaiki atau meningkatkan respon imun individu terhadap suatu antigen yang imunogenisitasnya lemah (Elgert, 1996). Pemilihan ajuvan dapat didasarkan pada target sistem imun atau efektor dari sistem imun yang dikehendaki. Secara umum ajuvan bekerja melalui beberapa mekanisme. Cara kerja ajuvan tersebut antara lain adalah memperlambat pelepasan antigen, menginduksi migrasi sel penyaji antigen seperti makrofag dan sel dendritik, meningkatkan pengambilan dan penyajian antigen oleh sel penyaji antigen (Elson and Dertzbaugh, 1994). Ajuvan juga dapat bekerja dengan merubah jalur proses antigen pada molekul MHC (*Major Histocompatibility Complex*), menginduksi perubahan fisiologi intraseluler, stimulasi produksi sitokin dan diferensiasi serta proliferasi limfosit ataupun menginduksi ekspresi molekul kostimulator tertentu untuk transduksi sinyal (Elson and Dertzbaugh, 1994; Giuliani *et al*, 1998 ; Abbas *et al*, 2000).

Pada sistem imun mukosa ajuvan yang banyak digunakan adalah ajuvan CT. Ajuvan ini mampu memperbaiki dan meningkatkan respon imun mukosa terutama pada antigen yang memiliki imunogenitas lemah (Elson *and* Dertzbaugh, 1994; Debard *et al*, 1996; Rappuoli *et al*, 1999; Williams *et al*, 1999; Martin *et al*, 2000).

Toksin kolera dihasilkan oleh bakteri *Vibrio cholera*. Toksin kolera terdiri atas dua subunit protein, yaitu subunit A dan subunit B (Braun *et al*, 1999). Subunit B dari CT (CtB) merupakan protein pentamer yang akan berikatan dengan reseptor GM<sub>1</sub>. (Fukuta *et al*, 1988; Sears and Kaper, 1996; Williams *et al*, 1999; Martin *et al*, 2000; Bowman and Clements, 2001; Wimer-Mackin *et al*, 2001). Ikatan antara GM<sub>1</sub> dengan CtB memudahkan subunit CtA berinteraksi dengan sel target (Lebens *et al*; Rappuoli *et al*, 1999). Ajuvan CT juga dapat berikatan dengan afinitas yang lemah pada reseptor GD<sub>1b</sub> (Fukuta *et al*, 1988; Williams *et al*, 1999). Konstanta disosiasi antara CT dengan reseptor GM<sub>1</sub> sebesar  $7,3 \times 10^{-10}$  M (Williams *et al*, 1999). Reseptor GM<sub>1</sub> bersifat ubiquitus (*ubiquitous*) yang artinya ditemukan pada semua sel eukaryot (Sears and Kaper, 1996; Williams *et al*, 1999).

Pada bidang imunologi, CT dapat dimanfaatkan sebagai ajuvan mukosa yang potensial (Rappuoli *et al*, 1999; Williams *et al*, 1999; Martin *et al*, 2000; Millar *et al*, 2001). Potensi tersebut didasarkan pada beberapa laporan penggunaan CT sebagai ajuvan untuk berbagai jenis antigen. Potensi CT sebagai ajuvan berhubungan dengan kemampuannya untuk mengubah transport antigen melintasi epitel, mengekspresikan molekul kostimulator pada APC dan meningkatkan diferensiasi sel B (Braun *et al*, 1999).

Mekanisme CT sebagai ajuvan memang belum diketahui dengan jelas, tapi diyakini berhubungan dengan adanya ikatan yang kuat antara CtB dengan reseptor GM<sub>1</sub>. Ikatan tersebut meningkatkan *uptake* antigen melintasi mukosa dan mempresentasikannya pada sistem imun (Holmgren *et al*, 1996; George-Chandy *et al*, 2001). Sub unit B dari CT memiliki kemampuan stimulasi sistem imun dengan cara menginduksi ekspresi MHC II pada sel B (George-Chandy *et al*, 2001). Terjadinya aktivasi sel limfosit (sel T) terhadap antigen dikontrol oleh *Antigen-presenting cell* (APC) yang mengabsorpsi, memproses dan mempresentasikan antigen melalui MHC II (George-Chandy *et al*, 2001).



## BAB 3

### KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN

#### 3.1 Kerangka Konseptual Penelitian

Penggunaan vaksin dari antigen *T.gondii* dimaksudkan untuk menginduksi munculnya respon imun. Respon imun yang muncul tersebut diharapkan akan mampu memberikan perlindungan atau proteksi yang spesifik terhadap infeksi *T.gondii*. Antigen protein solubel yang terdiri dari semua protein GRA, MIC, ROP serta sebagian SAG belum pernah dilaporkan pada penggunaan intranasal. Penggunaan protein solubel akan sangat menguntungkan karena memiliki potensi untuk menginduksi respon imun yang spesifik terhadap semua jenis antigen *T.gondii* yaitu SAG, GRA, MIC dan ROP (Cesbron-Delauw, 1996; Alexander *et al*, 1996; Yap *et al*, 1998). Diharapkan potensi proteksinya juga akan lebih baik dibanding penggunaan antigen secara parsial dari masing masing komponen protein solubel.

Aplikasi intranasal merupakan salah satu alternatif rute imunisasi yang efektif untuk menginduksi respon imun mukosa (Roussel *et al*, 1999). Adanya komponen sistem imun pada permukaan mukosa hidung, akan memfasilitasi antigen atau ajuvan yang diaplikasikan untuk berinteraksi dengan sel penyaji antigen dan menimbulkan respon imun lokal pada lokasi induksi, selanjutnya sel dendrit dan limfosit T yang teraktivasi tersebut bermigrasi ke mukosa usus sebagai lokasi target dan akan mengaktivasi limfosit B untuk menghasilkan IgA (Sminia and Kraal, 1999). Aplikasi tersebut dapat disertai dengan penggunaan ajuvan yang mampu memperbaiki dan meningkatkan kemampuan sistem imun mukosa untuk merespon antigen yang diberikan, salah satunya adalah ajuvan CT

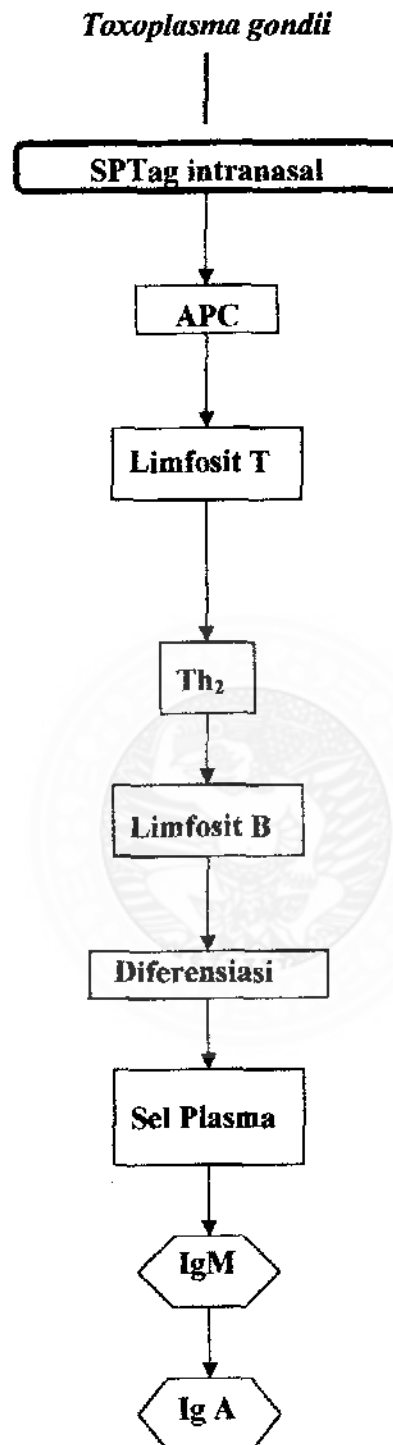


(Elson and Dertzbaugh, 1994; Debard *et al*, 1996; Rappuoli *et al*, 1999; Williams *et al*, 1999; Martin *et al*, 2000). Mekanisme kerja CT sebagai ajuvan mukosa belum diketahui dengan jelas, tetapi diyakini karena adanya ikatan yang erat antara CtB dengan reseptor GM<sub>1</sub> yang terdapat pada sel mukosa. Ikatan tersebut menyebabkan peningkatan *uptake* antigen dan menginduksi ekspresi MHC II pada APC. (George-Chandy, 2001).

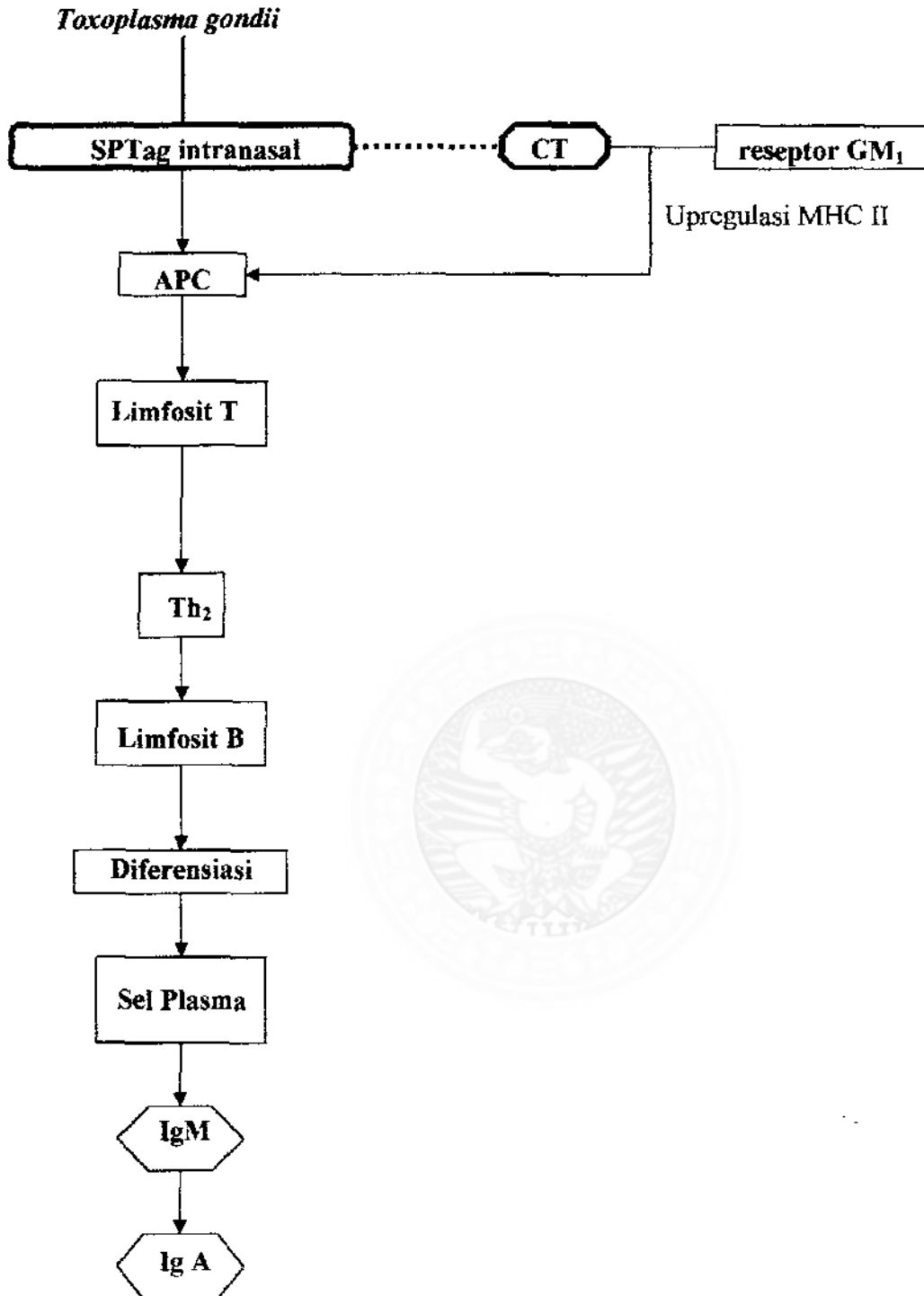
Antigen takizoit secara umum mengaktivasi APC seperti sel dendrit, makrofag maupun limfosit B. Aktivasi tersebut mengakibatkan teraktivasinya sel Th (sel Th<sub>1</sub> ataupun sel Th<sub>2</sub>) (Denkers and Gazzinelli, 1998). Sel Th<sub>2</sub> berfungsi untuk stimulasi limfosit B agar berproliferasi dan berdiferensiasi menjadi sel plasma untuk menghasilkan imunoglobulin. Munculnya IgM pada awal infeksi baik infeksi primer, reinfeksi maupun reaktivasi, merupakan tanda timbulnya respon humoral (Abbas *et al*, 2001). Sel Th<sub>2</sub> yang teraktivasi dan menimbulkan diferensiasi limfosit B, memungkinkan terjadinya *switching* IgM menjadi IgA pada serum maupun mukosa.

Di permukaan mukosa saluran usus, imunoglobulin yang dominan berperan adalah IgA. Imunoglobulin A bekerja dengan cara mengikat takizoit sehingga tidak dapat menembus sel epitel (Killian and Russell, 1994; Kasper and Buzoni-Gatel, 2001). Peningkatan titer IgA tersebut mampu meningkatkan resistensi mencit terhadap infeksi *T. gondii* (Darcy and Santoro, 1994; Gazzinelli *et al*, 1994; Denkers and Gazzinelli, 1998; Ceravolo *et al*, 1999; Vercammen *et al*, 2000).

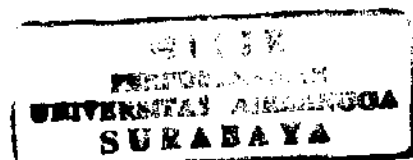
Berdasarkan kajian teoritis tersebut, disusun kerangka konseptual penelitian seperti yang terlihat pada halaman berikut ini :



Gambar 3.1 Skema respon IgA pada imunisasi dengan SPTAg tanpa ajuvan CT



Gambar 3.2 Skema respon IgA pada imunisasi dengan SPTAg dan ajuvan CT



### 3.2 Hipotesis Penelitian

1. Terdapat perbedaan respon imun berupa titer IgA mukosa usus akibat pemberian SPTAg *T. gondii* dengan atau tanpa ajuvan CT yang diaplikasikan intranasal.
2. Terdapat perbedaan di antara waktu *intestinal flushing* yang satu dengan yang lain, terhadap titer IgA mukosa usus.
3. Ada pengaruh/interaksi antara waktu pengamatan dengan pemberian SPTAg dan SPTAg dengan CT yang diaplikasikan intranasal terhadap titer IgA mukosa usus.

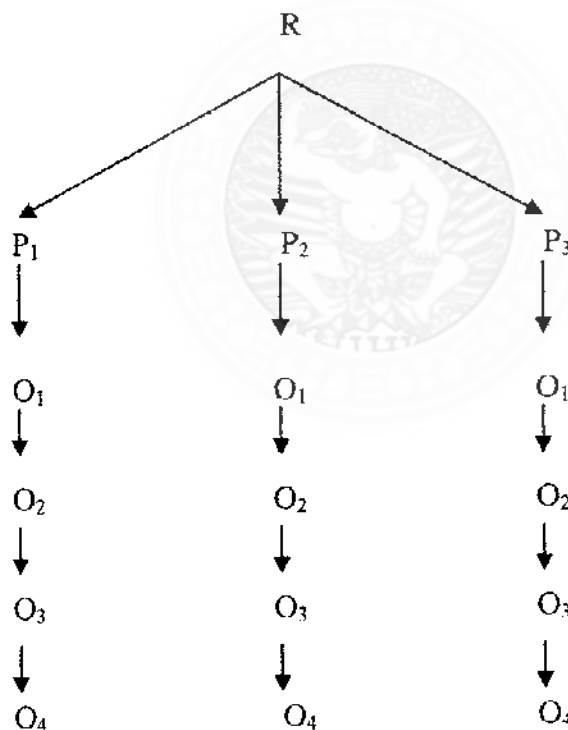


## BAB 4

### METODA PENELITIAN

#### 4.1 Rancangan penelitian

Jenis penelitian yang akan dilakukan adalah penelitian eksperimental laboratoris dengan menggunakan rancangan penelitian faktorial *Post Test Only* (3 x 4). Faktor pertama adalah pemberian SPTAg, faktor kedua adalah waktu pengukuran titer IgA. Secara skematis rancangan penelitian tersebut dapat digambarkan sebagai berikut (Torrice and Steel, 1989):



Gambar 4.1 Skema Rancangan penelitian

Keterangan :

- R : Randomisasi
- P1 : Kelompok perlakuan 1 yaitu kelompok kontrol (PBS)
- P2 : Kelompok Perlakuan 2 (SPTAg tanpa ajuvan CT)
- P3 : Kelompok Perlakuan 3 (SPTAg dengan ajuvan CT)
- O<sub>1</sub> : Pengukuran titer IgA setelah minggu I
- O<sub>2</sub> : Pengukuran titer IgA setelah minggu II
- O<sub>3</sub> : Pengukuran titer IgA setelah minggu III
- O<sub>4</sub> : Pengukuran titer IgA setelah minggu IV

#### 4.2. Populasi, Sampel, Besar Sampel dan Teknik Pengambilan Sampel

Subyek penelitian adalah kelompok mencit BALB/c betina, diperoleh dari populasi mencit di tempat penangkarnya di Pusat Veterineria Farma (Pusvetma), Yogyakarta. Sampel diambil dari populasi *infinite*, terdiri atas 48 ekor mencit, yang dibagi menjadi 3 kelompok perlakuan secara acak (*simple random sampling*) dengan cara mengundi dari populasi mencit yang terlebih dahulu diberi nomor (Zainuddin, 2001), yaitu; kelompok perlakuan 1 adalah kelompok kontrol yang diimunisasi dengan *Phospat Buffered Saline* (PBS); kelompok perlakuan 2 yang diimunisasi dengan SPTAg *T. gondii* tanpa ajuvan CT, dan kelompok perlakuan 3 adalah kelompok yang diimunisasi dengan SPTAg *T. gondii* dengan ajuvan CT. Semua imunisasi dilakukan secara intranasal.

Jumlah pengulangan atau replikasi ditentukan berdasarkan rumus Federer (Lemenschow *et al.*, 1990) :

$$(p - 1)(u - 1) \geq 15$$

$$(12-1)(u-1) \geq 15$$

$$11(u-1) \geq 15$$

$$11u - 11 \geq 15$$

$$u \geq 2,36 \rightarrow u \geq 3, \text{ jadi dilakukan 4 kali pengulangan}$$

Keterangan :

p = perlakuan (3 x 4)

u = ulangan

Sehingga banyaknya sampel yang diperlukan dalam penelitian ini yaitu 48 ekor mencit yang dibagi dalam 3 kelompok perlakuan, 4 kali pengukuran IgA, dan 4 kali pengulangan (replikasi).

### 4.3 Variabel Penelitian

#### 4.3.1 Variabel bebas

Variabel bebas pada penelitian ini adalah pemberian SPTAg *T. gondii* secara intranasal pada hewan coba dan waktu pengamatan.

#### 4.3.2 Variabel tergantung

Variabel tergantung pada penelitian ini adalah Ig A pada mukosa saluran cerna hewan coba.

#### 4.3.3 Definisi operasional variabel

- a. Antigen protein solubel *T. gondii* adalah kumpulan antigen yang terdiri atas antigen SAG, ROP, GRA dan MIC yang diisolasi secara bersamaan dari *T. gondii* (Cesbron-Delauw, 1999).
- b. Titer Ig A adalah nilai OD hasil pengukuran kadar Ig A dari mukosa saluran cerna (*intestinal flushing*) hewan coba dengan teknik ELISA tidak langsung (*indirect ELISA*) (Alexander *et al*, 1996).

- c. Ajuvan CT adalah substansi yang dihasilkan bakteri *Vibrio cholera* yang berfungsi untuk memperbaiki atau meningkatkan respon imun individu terhadap suatu antigen yang imunogenitasnya lemah (Elgert, 1996; Sears and Kaper, 1996).

#### 4.4 Bahan Penelitian

Bahan untuk imunisasi adalah SPTAg hasil isolasi dari takizoit *T. gondii* galur RH yang diperoleh dari Program Studi Bioteknologi, Universitas Gadjah Mada dan ajuvan yang digunakan adalah ajuvan CT (Sigma Chem., USA).

Bahan-bahan yang digunakan untuk titrasi IgA dengan teknik ELISA (*enzyme linked immunosorbent assay*) yaitu, cairan mukosa usus yang diambil (*flushing*) setiap minggu satu kali sebagai antibodi primer, *coating buffer*, *blocking huffer*, *incubation buffer*, *substrate buffer*, *washing buffer* serta *p-nitrophenyl phosphatase* sebagai substrat, dan *goat anti mouse IgA (α chain specific) alkaline phosphatase conjugated* (Sigma Chem., USA) sebagai antibodi sekunder, dan juga H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> sebagai *stop solution* untuk menghentikan reaksi ELISA.

Hewan coba yang digunakan untuk penelitian adalah mencit BALB/c betina yang dibeli dari Pusat Veterineria Farma (Pusvetma), Yogyakarta, berumur antara 6 sampai 8 minggu dengan berat badan rata rata 15 – 20 gram (Bonenfant *et al*, 2001).

#### 4.5 Instrumen Penelitian

Alat-alat yang diperlukan adalah:

- Untuk imunisasi, digunakan mikropipet (10 µl) dan tips.



- Untuk *flushing intestinal*, digunakan alat berupa gunting, pinset, tabung eppendorf Plastibrand (Brand GmbH, Germany), Sentrifus Hermle Z 2314 (Hermle AG, Germany) dan freezer-20<sup>0</sup>C.
- Untuk ELISA, digunakan peralatan berupa Nunc – Immuno™ *maxisorb* 96 well microplate untuk ELISA (Nunc Int., Denmark), ELISA Reader Titertek Multiskan MCC/ 340 (Labsystems, Finland), tabung eppendorf Plastibrand (Brand GmbH, Germany), tips untuk mikropipet (masing masing 0,1 – 10 µl ; 40 – 200 µl dan 200 – 1000µl), Sentrifus Hermle Z 2314 (Hermle AG, Germany), inkubator, refrigerator dan freezer -20<sup>0</sup>C.

#### 4.6 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Pusat Antar Universitas (PAU) Bioteknologi Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada Yogyakarta mulai bulan Mei 2004 sampai Agustus 2004.

#### 4.7 Prosedur Penelitian

Prosedur pelaksanaan penelitian terdiri atas beberapa tahapan sebagai berikut :

##### 4.7.1 Tahap isolasi antigen

Antigen yang digunakan dalam penelitian berupa SPTAg dari takizoit *T. gondii* galur RH. Proses isolasi SPTAg sampai siap digunakan untuk vaksinasi terdiri atas tiga tahapan. Tahap pertama yaitu perbanyakan takizoit di dalam tubuh mencit, kedua adalah isolasi SPTAg dari takizoit, dan ketiga adalah

pengukuran kadar SPTAg yang telah diperoleh. Tahapan tersebut dapat dirinci sebagai berikut berikut :

**a. Perbanyakkan takizoit *T. gondii***

Takizoit *T. gondii* yang diperbanyak berasal dari stabilat beku *T. gondii* galur RH yang disimpan dalam nitrogen cair atau freezer – 70 °C di Laboratorium Bioteknologi, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta. Setelah dilakukan *thawing*, stabilat disuntikkan intraperitoneal pada mencit galur Swiss untuk perbanyakkan takizoit dengan dosis infeksi sebesar  $1 \times 10^7$  per ekor mencit sebanyak tiga ekor untuk pasase pertama dari stabilat. Hasil panen takizoit dari pasase pertama disuntikkan lagi ke – 40 ekor mencit atau lebih untuk perbanyakkan pasase kedua. Sebagian sisanya (dari hasil panen perbanyakkan pasase pertama) dibuat sebagai stabilat. Tujuan utama perbanyakkan pasase kedua adalah memperoleh jumlah minimal  $1 \times 10^9$  takizoit untuk sekali proses isolasi. Apabila jumlah takizoit total dari panen pasase kedua kurang dari  $1 \times 10^9$  atau jumlah SPTAg yang diisolasi masih belum mencukupi sesuai yang diharapkan, maka perbanyakkan takizoit dilanjutkan pada pasase selanjutnya.

**b. Panen takizoit dan isolasi SPTAg**

Takizoit dipanen dari cairan peritoneum mencit yang diinfeksi. Setelah mencit dibunuh dengan cara dislokasi leher, dibaringkan dengan posisi terlentang dan rongga abdomen dibuka. NaCl fisiologis sebanyak 5 – 10 ml disuntikkan secara intraperitoneal dalam rongga peritoneum. Setelah maserasi untuk homogenisasi, cairan dari rongga peritoneum kembali dihisap menggunakan *syringe* dan ditampung dalam tabung konikal. Selanjutnya tabung konikal

disentrifus menggunakan Megafuge 1.0 dengan kecepatan 3000 rpm selama 10 menit.

Apabila dalam pelet masih terdapat eritrosit maka dilakukan penambahan amonium klorida dan diresuspensi. Hasil resuspensi kembali disentrifus selama 10 menit dengan kecepatan 3000 rpm setelah sebelumnya ditambahkan pula NaCl. Setelah pelet bersih dari eritrosit, maka pelet kembali diresuspensi dalam NaCl dan dilewatkan melalui jarum 27 G ke dalam tabung konikal bersih lainnya. Suspensi takizoit yang telah dilewatkan jarum 27 G diperiksa dalam hemositometer Neubeuer dan dihitung jumlahnya.

Takizoit yang telah dipanen dan dihitung tersebut diresuspensi dalam NaCl yang telah diisi dengan protease inhibitor PMSF 1 mM dan TPCK 10 µg/ml. Selanjutnya suspensi takizoit disonikasi pada 180 m amplitudo, selama 1 menit, sebanyak 10 kali. Kemudian disentrifus dengan kecepatan 3000 rpm selama 30 menit pada temperatur 4 °C menggunakan sentrifus Beckman J – 6B. Supernatan yang diperoleh merupakan antigen terlarut yang mengandung semua jenis antigen sekretori dan ekskretori baik MIC, ROP maupun GRA.

SPTAg yang telah dipurifikasi kemudian diukur konsentrasinya secara kuantitatif menggunakan *BioRad Protein Assay*, digunakan untuk vaksinasi dan pelapisan (*coating*) pada mikroplate saat dilakukan ELISA.

### c. Pengukuran konsentrasi SPTAg

Pengukuran konsentrasi SPTAg yang telah diperoleh dilakukan dengan menggunakan *BioRad Protein Assay* (Sigma Chem, USA). Sebelum dilakukan pengukuran konsentrasi SPTAg dari *T. gondii*, terlebih dahulu dibuat kurva baku standar menggunakan BSA (*bovine serum albumine*). Stok larutan BSA (1 mg

BSA/ml H<sub>2</sub>O) masing masing diambil 5 µl (a), 10 µl (b), 15 µl (c) dan 20 µl (d). Selanjutnya setiap mikrovolume stok BSA dicampur dengan 795 µl (a), 790 µl (b), 785 µl (c) dan 780 µl (d) ddH<sub>2</sub>O (*double destilated H<sub>2</sub>O*) dalam setiap tabung eppendorf.

Kemudian larutan *BioRad Protein Assay* ditambahkan pada semua tabung eppendorf (a–d) dengan volume masing masing 200 µl. Setelah dihomogenisasi, larutan BSA – Biorad – ddH<sub>2</sub>O dibaca dengan spektrofotometer Beckman DU<sup>®</sup> 65 (Smithkline Beckman, USA) pada panjang gelombang 595. Hasil pembacaan dengan spektrofotometer kemudian dibuat menjadi kurva baku standar untuk penetapan kadar SPTAg dari *T. gondii* galur RH.

Pada pengukuran kadar SPTAg, disiapkan 2 tabung eppendorf yang sebelumnya telah diisi dengan ddH<sub>2</sub>O masing masing 798 µl dan 796 µl. Selanjutnya kedua tabung eppendorf tersebut diisi dengan 200 µl Biorad. SPTAg dari *T. gondii* yang diperoleh kemudian diambil masing masing dengan volume 2 µl dan 4 µl dan dihomogenisasi. Setelah homogen masing masing eppendorf dibaca dengan spektrofotometer Beckman DU<sup>®</sup> 65 pada panjang gelombang 595. Nilai OD yang diperoleh dari kedua sampel tersebut kemudian dikonversi menggunakan kurva baku standar dari BSA. Hasil konversi tersebut kemudian dinyatakan sebagai kadar SPTAg dalam satuan µg/µl.

#### 4.7.2 Imunisasi

Imunisasi dilakukan secara intranasal terhadap semua sampel dengan meneteskan SPTAg (dalam PBS) dan ajuvan dalam nostril mencit BALB/c. Imunogen yang digunakan adalah SPTAg dengan atau tanpa ajuvan CT. Dosis

SPTAg yang digunakan adalah 1,25 µg/µl (10 µg per ekor) (Debard *et al.*, 1996). Sedangkan dosis ajuvan yang diberikan yaitu CT dengan dosis 1µg per ekor (Douce *et al.*, 1997). Total volume imunogen adalah 8 ml per ekor (untuk 2 nosteril). Imunisasi dilakukan satu kali pada awal penelitian dengan meneteskan imunogen pada kedua nostril mencit.

#### 4.7.3 Pengambilan cairan mukosa (*flushing*).

Cairan mukosa saluran usus mencit diperoleh dengan *flushing*. *Flushing* dilakukan dengan menggunakan 2-3 ml PBS yang mengandung 2nM PMSF, 10 µg TPCK, 0,02% NaN<sub>3</sub>, 5 mM EDTA, penisilin serta streptomisin (Modifikasi dari Yun *et al.*, 2000) ke dalam saluran usus halus yang sebelumnya telah dipotong. Cairan *flushing* ditampung dalam eppendorf disimpan dalam 4°C selama 2 jam dan kemudian disentrifus 10,000 rpm selama 4 menit. Supernatan cairan *flushing* dipisahkan kemudian ditampung dalam tabung eppendorf. Cairan *flushing* yang telah diproses tersebut selanjutnya disimpan dalam *freezer* -20°C sampai saat evaluasi dilakukan dengan ELISA. *Flushing* dilakukan 4 kali dengan interval 7 hari.

Adapun jadwal imunisasi dan pengambilan cairan *flushing* dapat dilihat pada tabel 4.1 berikut ini :

Tabel 4.1. Jadwal imunisasi dan pengambilan cairan *flushing*

Waktu	Kegiatan
Hari I	Imunisasi
Minggu I	Pengambilan cairan mukosa ke-1 ( <i>flushing</i> )
Minggu II	Pengambilan cairan mukosa ke-2 ( <i>flushing</i> )
Minggu III	Pengambilan cairan mukosa ke-3 ( <i>flushing</i> )
Minggu IV	Pengambilan cairan mukosa ke-4 ( <i>flushing</i> )

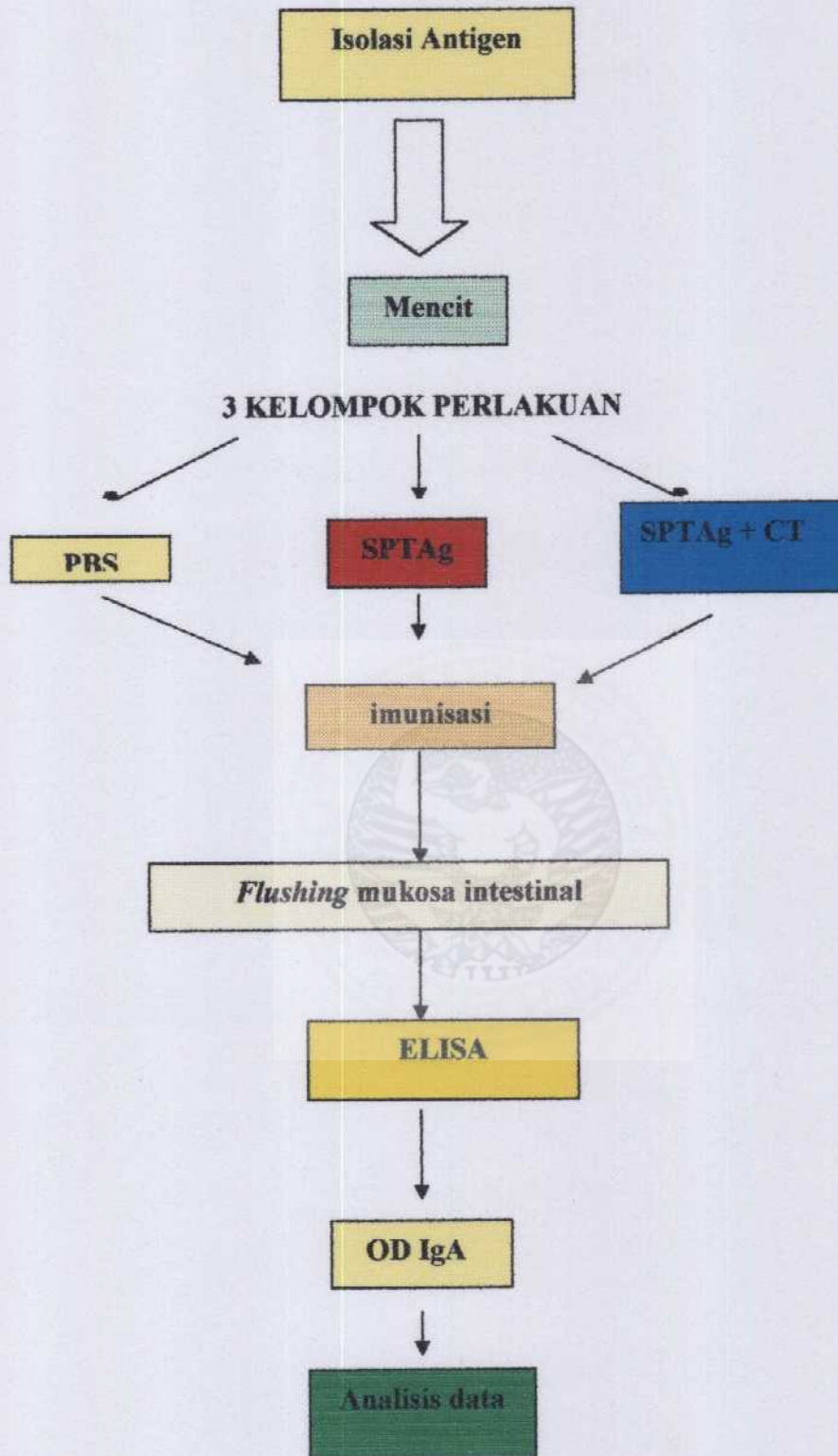
#### 4.7.4 Prosedur ELISA

Secara prinsip pengukuran titer imunoglobulin dilakukan dengan teknik ELISA tidak langsung (*indirect ELISA*).

Antigen dilapiskan (*coating*) pada microplate dengan konsentrasi 10 µg/ml dan diinkubasi pada suhu 4°C selama 24 jam. Setelah 24 jam, dilakukan pencucian dengan PBS-Triton X-100. Selanjutnya pada masing-masing sumuran microplate ditambahkan cairan *flushing* dan diinkubasi pada 37°C selama satu jam. Kemudian dicuci dengan PBS-Triton X100. Ditambahkan konjugat *goat anti mouse IgA alkaline phosphatase* yang diencerkan 1 : 1500 dan diinkubasi selama 1 jam pada 37°C. Microplate dicuci lagi dengan PBS-Triton X100. Kemudian ditambahkan nitrofenilfosfat pada setiap sumuran dan diinkubasi pada 37°C selama 10-20 menit. Reaksi yang terjadi dihentikan dengan menambahkan H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Hasil pengukuran yang dinyatakan dalam nilai kerapatan optik (*Optical Density, OD*) dibaca dengan *ELISA reader* pada 405 nm. Pencucian pada setiap tahapan dilakukan sebanyak 3 kali.

#### 4.8 Cara Pengolahan dan Analisis Data

Data yang terkumpul yang diperoleh dari hasil pengukuran titer Ig A dari cairan mukosa usus hewan coba masing-masing kelompok perlakuan ditabulasi dan dibuat grafik untuk disajikan secara deskriptif. Kemudian dilakukan analisis statistik dengan anava faktorial dan uji lanjut LSD dengan tingkat kepercayaan 95% ( $\alpha = 0,05$ ).



Gambar 4.2 Skema prosedur penelitian

## BAB 5

## ANALISIS HASIL PENELITIAN

## 5.1 Hasil Penelitian

Hasil deskriptif data penelitian adalah sebagai berikut :

Tabel 5.1. Nilai OD pada tiap perlakuan dan tiap ulangan

Waktu	Perlakuan	Ulangan				Rata-rata	SD
		1	2	3	4		
Minggu I	PBS	0,41	0,286	0,287	0,286	0,317	0,062
	SPTAg	0,706	0,660	0,643	0,670	0,669	0,026
	SPTAg+CT	0,322	0,374	0,485	0,363	0,386	0,0696
Minggu II	PBS	0,244	0,26	0,286	0,41	0,300	0,075
	SPTAg	0,47	0,578	0,502	0,428	0,494	0,063
	SPTAg+CT	0,621	0,539	0,541	0,567	0,567	0,038
Minggu III	PBS	0,287	0,391	0,26	0,286	0,306	0,058
	SPTAg	0,422	0,395	0,37	0,429	0,404	0,027
	SPTAg+CT	0,427	0,51	0,747	0,845	0,632	0,196
Minggu IV	PBS	0,391	0,244	0,26	0,287	0,295	0,066
	SPTAg	0,391	0,457	0,333	0,292	0,368	0,072
	SPTAg+CT	0,7	0,42	0,634	0,45	0,551	0,137

Keterangan : PBS = Kelompok perlakuan dengan pemberian PBS  
 SPTAg = Kelompok perlakuan dengan pemberian SPTAg  
 SPTAg+CT =Kelompok perlakuan dengan pemberian SPTAg + CT  
 SD = Standar Deviasi

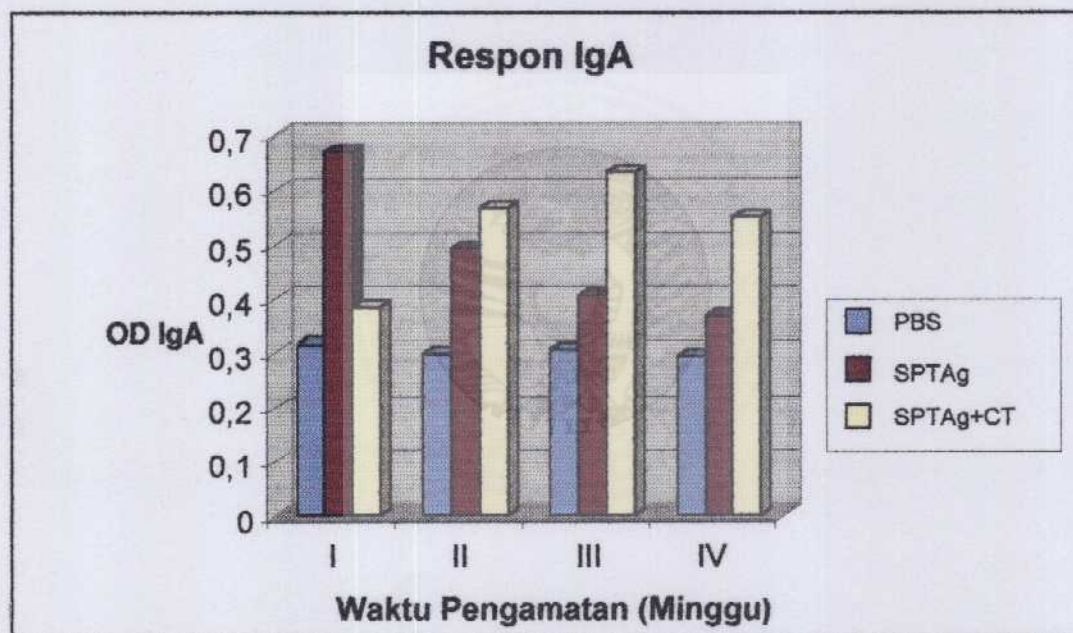


Nilai OD Ig A positif bila :

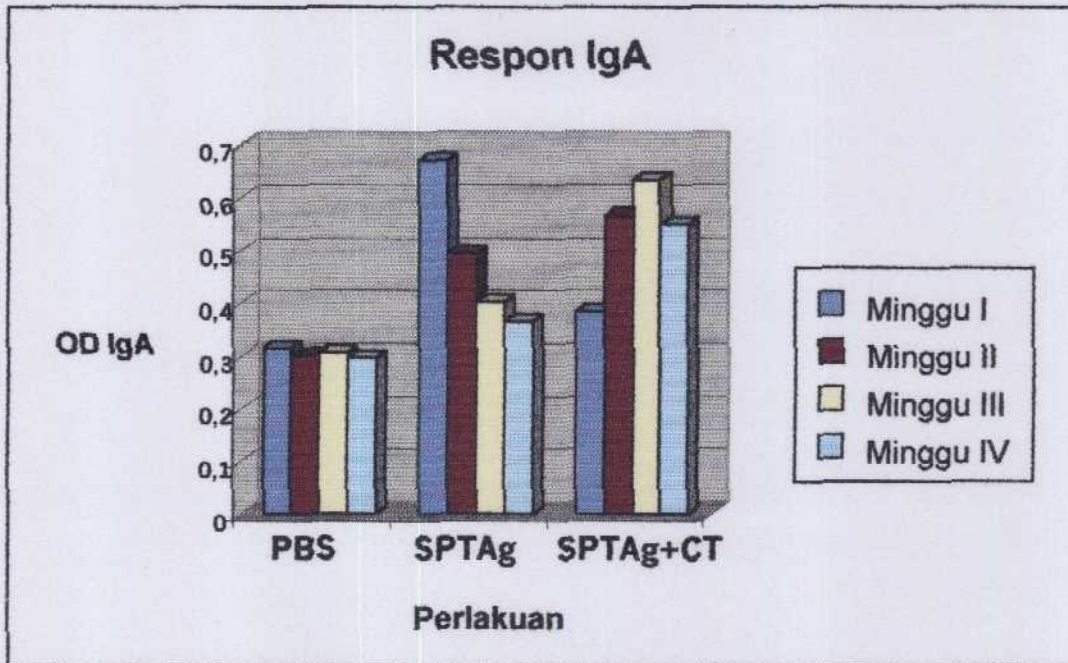
OD rata-rata tiap perlakuan  $\geq$  jumlah rata-rata OD PBS + (2xSD PBS)

Dari perhitungan didapatkan OD Ig A positif bila  $\geq 0,438$

Gambaran respon imun IgA berdasarkan nilai OD pada masing-masing kelompok perlakuan (Tabel 5.1) adalah sebagai berikut:



Gambar 5.1 Gambaran respon imun IgA pada tiap waktu pengamatan berdasarkan rata-rata nilai OD



Gambar 5.2 Gambaran respon Imun IgA pada tiap perlakuan berdasarkan rata-rata nilai OD

Untuk kelompok perlakuan dengan pemberian PBS sebagai kontrol, nilai rata-rata OD tertinggi pada minggu I adalah 0,317. Perlakuan dengan pemberian SPTAg menunjukkan nilai rata-rata OD tertinggi pada minggu I adalah 0,669, dan terus menurun pada minggu-minggu berikutnya. Sedangkan SPTAg+CT, nilai rata-rata OD terendah pada minggu I adalah 0,386 dan tertinggi pada minggu III adalah 0,632. Untuk analisis statistik deskriptif secara lengkap tercantum pada Lampiran 2 dan Lampiran 5.

## 5.2 Analisis Hasil Penelitian

Berdasarkan tingkat kepercayaan sebesar 95%, probabilitas 5%, maka perbedaan dianggap signifikan jika  $p < 0,05$  dan tidak signifikan jika  $p > 0,05$ .

### 5.2.1 Analisis statistik *One Sample Kolmogorov Smirnov Test*

Analisis ini digunakan untuk menguji distribusi normal data.

Tabel 5.2 Hasil Analisis *Kolmogorov Smirnov Test*

		PBS	SPTAg	SPTAg + CT	Interpretasi
Minggu I	Z	0,875	0,500	0,37	Tidak signifikan terhadap distribusi normal
	P	0,428	0,964	0,812	Tidak signifikan terhadap distribusi normal
Minggu II	Z	0,647	0,406	0,504	Tidak signifikan terhadap distribusi normal
	P	0,796	0,997	0,961	Tidak berbeda nyata terhadap distribusi normal
Minggu III	Z	0,757	0,495	0,467	Tidak signifikan terhadap distribusi normal
	P	0,616	0,967	0,981	Tidak signifikan terhadap distribusi normal
Minggu IV	Z	0,602	0,377	0,538	Tidak signifikan terhadap distribusi normal
	P	0,861	0,999	0,934	Tidak signifikan terhadap distribusi normal

Keterangan :

P= probabilitas

Z= harga kurva normal

Hasil uji *Kolmogorov Smirnov Test* pada Tabel 5.2 menunjukkan hasil yang tidak signifikan ( $p > 0,05$ ), dengan demikian data berdistribusi normal sehingga data dapat dianalisis statistik parametrik. Uji *Kolmogorov Smirnov* selengkapnya dapat dilihat pada Lampiran 1a-1f.

### 5.2.2 Analisis Anava faktorial

Analisis ini digunakan untuk mengetahui perbedaan dan interaksi antara faktor-faktor yang ada.

Tabel 5.3 Hasil analisis Anava faktorial

Faktor	Nilai F	P	Interpretasi
Waktu	0,937	0,433	Tidak signifikan
Perlakuan	30,539	0,000	Signifikan
Interaksi Waktu-Perlakuan	7,191	0,000	Signifikan

Keterangan :

F = *fisher*(perbandingan rata-rata kuadrat perlakuan dan kesalahan)

P= probabilitas

Hasil analisis dengan anava faktorial pada Tabel 5.2 tersebut menunjukkan faktor waktu tidak berbeda nyata ( $p > 0,05$ ). Sehingga dapat disimpulkan bahwa keempat waktu yang diujicobakan tidak memberikan perbedaan OD yang signifikan. Sedangkan untuk perlakuan dan interaksi antara waktu dan perlakuan menunjukkan perbedaan yang nyata ( $p < 0,05$ ). Jadi perlakuan yang diujicobakan memberikan perbedaan OD yang signifikan, demikian pula dengan berbagai interaksi tersebut, memberikan hasil OD IgA yang berbeda nyata (signifikan). Hasil uji ini selengkapnya dapat dilihat pada Lampiran 3.

### 5.2.3 Analisis Uji Lanjut dengan Beda Nyata Terkecil (*Least Significant Different, LSD*)

Uji LSD ini dilakukan untuk mengetahui lebih lanjut letak perbedaan dan interaksi dari masing-masing faktor yang dianalisis.

#### 5.2.3.1 Waktu pengamatan (minggu)

Analisis ini dilakukan untuk mengetahui lebih lanjut letak perbedaan diantara waktu pengamatan yang satu dengan yang berikutnya.

Tabel 5.4 Hasil uji LSD untuk waktu pengamatan

Waktu pengamatan yang dibandingkan		Signifikansi	Interpretasi
Minggu I	Minggu II	0,916	Tidak berbeda nyata
	Minggu III	0,776	Tidak berbeda nyata
	Minggu IV	0,148	Tidak berbeda nyata
Minggu II	Minggu III	0,858	Tidak berbeda nyata
	Minggu IV	0,178	Tidak berbeda nyata
Minggu III	Minggu IV	0,241	Tidak berbeda nyata

Uji LSD untuk perbandingan antara waktu pengamatan yang satu dengan waktu pengamatan berikutnya, semua tidak berbeda nyata ( $p > 0,05$ ). Analisis LSD untuk waktu pengamatan selengkapnya dapat dilihat pada Lampiran 4a. Namun, pada hasil uji regresi didapatkan hasil yang signifikan. ( $p < 0,05$ ). Hasil uji ini selengkapnya dapat dilihat pada Tabel 5.5, tabel 5.6, Gambar 5.3 dan Gambar 5.4 serta lampiran 5.

Perlakuan : SPTAg

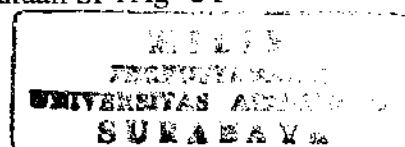
	DF	Sum of Squares	Mean Square
Regression	2	.21734252	.10867126
Residuals	13	.03199142	.00246088
F =	44.15954	Signifikansi	F = .0000

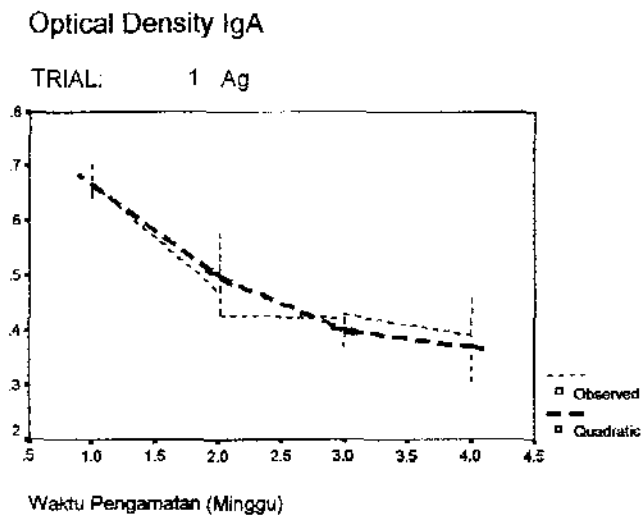
Tabel 5.5 Hasil uji regresi untuk waktu pada perlakuan SPTAg

Perlakuan : SPTAg +CT

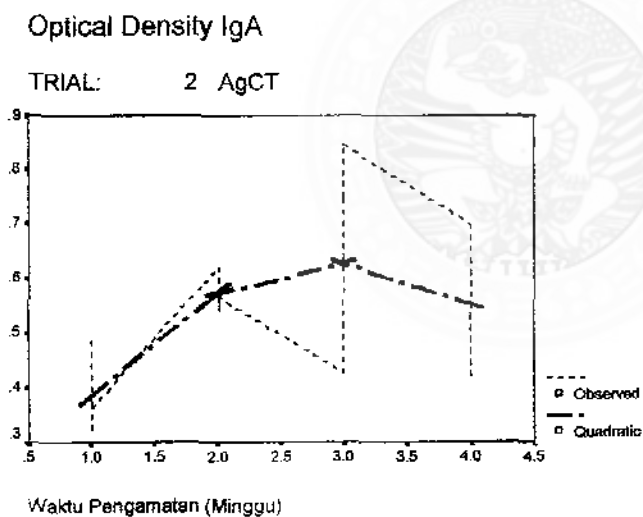
	DF	Sum of Squares	Mean Square
Regression	2	.13155108	.06577554
Residuals	13	.19108986	.01469922
F =	4.47476	Signifikansi	F = .0332

Tabel 5.6 Hasil uji regresi untuk waktu dengan perlakuan SPTAg+CT





Gambar 5.3 Hasil gambaran kurva uji regresi waktu pengamatan pada perlakuan dengan menggunakan SPTAg+CT



Gambar 5.4 Hasil gambaran kurva uji regresi waktu pengamatan pada perlakuan dengan menggunakan SPTAg

### 5.2.3.2 Perlakuan

Analisis ini dilakukan untuk mengetahui lebih lanjut letak perbedaan diantara perlakuan yang diujicobakan terhadap OD IgA.

Tabel 5.7 Hasil Uji LSD untuk perlakuan

Perlakuan yang dibandingkan		Signifikansi	Interpretasi
PBS	SPTAg	0,000	Signifikan
	SPTAg + CT	0,000	Signifikan
SPTAg	SPTAg + CT	0,114	Tidak signifikan

Uji LSD perbandingan antara perlakuan dengan perlakuan, menunjukkan hasil yaitu PBS dengan SPTAg berbeda nyata ( $p < 0,05$ ), demikian pula PBS dengan SPTAg ditambah ajuvan CT menghasilkan perbedaan yang nyata ( $p < 0,05$ ). Sedangkan SPTAg dan SPTAg ditambah ajuvan CT tidak berbeda nyata ( $p > 0,05$ ). Hasil analisis ini secara lengkap terdapat pada Lampiran 4b.

### 5.2.3.3 Interaksi waktu pengamatan dan perlakuan

Analisis ini untuk mengetahui lebih lanjut letak interaksi antara waktu pengamatan (*pengambilan flushing*) dan perlakuan. Hasil analisis ini selengkapnya dapat dilihat pada Lampiran 4c-4f.

Tabel 5.8 Hasil Uji LSD terhadap waktu pengamatan dan perlakuan

Waktu pengamatan-perlakuan	Rata-rata	±	SD
Minggu I-PBS	0,317 <sup>a</sup>	±	0,062
Minggu II-PBS	0,300 <sup>a</sup>	±	0,075
Minggu III-PBS	0,306 <sup>a</sup>	±	0,058
Minggu IV-PBS	0,296 <sup>a</sup>	±	0,006
Minggu I-SPTAg	0,670 <sup>b</sup>	±	0,027
Minggu II-SPTAg	0,495 <sup>a</sup>	±	0,063
Minggu III-SPTAg	0,404 <sup>a</sup>	±	0,027
Minggu IV-SPTAg	0,368 <sup>a</sup>	±	0,072
Minggu I-SPTAg + CT	0,386 <sup>a</sup>	±	0,070
Minggu II- SPTAg + CT	0,567 <sup>b</sup>	±	0,038
Minggu III- SPTAg + CT	0,632 <sup>b</sup>	±	0,196
Minggu IV- SPTAg + CT	0,551 <sup>b</sup>	±	0,137

Keterangan: Apabila mengandung koefisien dengan huruf yang sama berarti tidak signifikan.

Contoh :

- 0,317<sup>a</sup> berarti interaksi antara Minggu I-PBS tidak berbeda nyata dengan Minggu II-PBS (0,300<sup>a</sup>), tetapi berbeda nyata dengan Minggu I-SPTAg (0,670<sup>b</sup>).
- 0,404<sup>a</sup> berarti interaksi antara Minggu III-SPTAg tidak berbeda nyata dengan Minggu IV-SPTAg (0,368<sup>a</sup>) dan juga Minggu I-SPTAg+CT (0,368<sup>a</sup>), tetapi berbeda nyata dengan Minggu III-SPTAg+CT (0,632<sup>b</sup>).



## BAB 6

### PEMBAHASAN

Penentuan titer IgA dalam cairan mukosa usus dapat didasarkan pada nilai kerapatan optik (*Optical Density*, OD) dengan teknik ELISA. Nilai OD pada ELISA merupakan kuantifikasi yang didasarkan pada perubahan warna dari reaksi enzim – substrat dan dibaca dengan suatu spektrofotometer yaitu *ELISA reader*. Perubahan warna yang dikuantifikasi menjadi nilai OD tersebut berbanding lurus dengan respon imun yang diukur. Respon IgA dinyatakan positif apabila memiliki nilai OD lebih besar atau sama dengan jumlah dari rata rata OD kontrol negatif ditambah dengan dua kali deviasi standar dari nilai OD kontrol negatif (Paul, 1999; Aubert *et al*, 2000).

Berdasarkan uji statistik anava faktorial dan uji LSD (Tabel 5.3, Tabel 5.4 serta lampiran 4a) ternyata waktu pengambilan cairan mukosa usus (*flushing*) tidak berpengaruh terhadap respon imun IgA, tetapi dengan uji regresi (Tabel 5.5 dan Tabel 5.6) didapatkan hasil yang signifikan ( $p < 0,05$ ). Sedangkan pada perlakuan serta interaksi antara waktu dan perlakuan didapatkan hasil yang signifikan ( $p < 0,05$ ) (Tabel 5.3 dan Tabel 5.8 serta Lampiran 4c-4f). Ini menunjukkan bahwa perlakuan dengan pemberian SPTAg dan SPTAg ditambah CT menyebabkan perbedaan respon imun IgA yang berbeda nyata dibandingkan PBS sebagai kontrol perlakuan. Hasil penelitian ini secara umum sesuai dengan laporan sebelumnya yang menyatakan bahwa penggunaan SPTAg intranasal

menyebabkan perubahan pola atau profil respon imun IgA pada cairan mukosa usus (Subekti dan Arrasyid, 2002).

Kelompok mencit yang diimunisasi intranasal menggunakan SPTAg tanpa ajuvan ternyata dapat menginduksi respon IgA sejak minggu pertama dan terus menurun sampai akhir pengamatan yaitu minggu keempat. Hal ini dapat dilihat dari nilai OD pada minggu I, yaitu 0,67 dan pada minggu IV, yaitu 0,386 (Tabel 5.1, Gambar 5.1 dan 5.2). Hasil tersebut didukung dengan analisis statistik, penggunaan SPTAg tanpa ajuvan pada minggu I memperlihatkan perbedaan yang signifikan dibandingkan penggunaan SPTAg pada minggu II sampai minggu IV (Tabel 5.8 dan Lampiran 4c-f).

Akan tetapi, sebaliknya pada kelompok dengan menggunakan ajuvan CT, menunjukkan respon IgA yang lebih rendah pada minggu pertama (0,386), tetapi kemudian diikuti peningkatan yang nyata pada minggu ketiga (0,632) dan mempertahankan respon IgA sampai minggu keempat (0,551) (Tabel 5.1, Gambar 5.1 dan 5.2). Analisis statistik menunjukkan bahwa perlakuan menggunakan SPTAg dengan ajuvan CT juga memperlihatkan adanya hasil yang signifikan pada respon imun IgA mingguan yang diamati ( $p < 0,05$ ). Perbedaan yang signifikan terjadi antara minggu pertama, yang merupakan titer terendah, dengan minggu ketiga, yang merupakan puncak respon imun IgA pada permukaan mukosa usus. Sedangkan pada minggu kedua dan minggu keempat didapatkan perbedaan yang tidak signifikan dibandingkan dengan minggu ketiga (Tabel 5.8 dan Lampiran 4c-4f). Hal ini mendukung profil respon IgA yang diinduksi dengan ajuvan CT yang cenderung menurun secara perlahan karena nilai OD yang tidak signifikan pada interval tiga minggu tersebut (Gambar 5.1, Gambar 5.2 dan Lampiran 5).

Respon IgA pada mukosa usus pada imunisasi intranasal menggunakan SPTAg tanpa ajuvan walaupun dapat menimbulkan IgA lebih cepat daripada dengan ajuvan, tetapi tidak dapat bertahan lama. Kondisi demikian juga terjadi pada penelitian serupa sebelumnya (Debard *et al.*, 1996; Subekti dan Arrasyid, 2002). Diduga bahwa secara natural, IgA akan berasosiasi dengan lapisan mukus dipermukaan mukosa usus, sedangkan yang berada dalam lumen saluran usus akan mudah mengalami degradasi sehingga konsentrasi dapat menurun secara cepat. Pada pengambilan sampel, IgA yang diperoleh pada umumnya adalah IgA dalam lumen mukosa, sehingga adanya degradasi IgA dalam mukosa usus kemungkinan disebabkan oleh beberapa flora normal di saluran usus (Kilian and Russell, 1994). Sedangkan pada imunisasi dengan menggunakan ajuvan, IgA tetap bertahan di dalam lumen usus, hal ini dapat diasumsikan bahwa bakteri di dalam ajuvan dapat mengurangi terjadinya degradasi IgA oleh flora normal. Beberapa hasil penelitian lain sebelumnya telah menunjukkan bahwa penurunan IgA yang cepat dapat terjadi dalam kurun waktu 1 sampai 2 minggu setelah imunisasi tanpa menggunakan ajuvan (Debard *et al.*, 1996; Subekti dan Arrasyid, 2002).

Penggunaan ajuvan CT pada minggu awal akan menyebabkan supresi temporer yang menyebabkan respon imun imunoglobulin menjadi rendah. Namun demikian sekitar dua sampai tiga minggu setelah imunisasi terakhir akan terjadi peningkatan respon imun IgA yang nyata. Hal demikian telah dilaporkan oleh Subekti dan Arrasyid (2002) yang menyatakan, bahwa puncak titer IgA mukosa usus terhadap SPTAg dicapai pada minggu keempat sampai kelima setelah dilakukan *booster* pada minggu kedua. Debard *et al.* (1996) juga

melaporkan bahwa penggunaan ajuvan CT secara nyata akan menginduksi peningkatan IgA mukosa usus dan mencapai puncak sekitar tiga minggu berikutnya (kurang lebih duapuluh lima hari).

Rendahnya respon IgA pada kelompok dengan menggunakan ajuvan pada fase awal, terjadi karena secara teoritis penggunaan ajuvan CT akan menyebabkan supresi temporer di fase awal akibat deplesi populasi limfosit T (sel T) khususnya sel Th di lokasi induksi, yaitu di mukosa nasal atau hidung. Supresi tersebut disebabkan oleh peningkatan aktivitas cAMP intraseluler pada sel T (Yamamoto *et al*, 1999; Bowman and Clements, 2001). Apabila sel T yang teraktivasi mengalami deplesi maka jumlah populasi sel T teraktivasi yang akan bermigrasi juga akan menurun. Menurut Sminia and Kraal (1999) sel T yang teraktivasi di mukosa nasal akan bermigrasi ke dalam sistem sirkulasi (sistemik) dan selanjutnya akan menuju mukosa usus. Apabila jumlah sel T teraktivasi yang bermigrasi menurun maka aktivasi sel B juga mengalami reduksi sehingga respon yang terjadi suboptimal.

Supresi yang terjadi tidak berlangsung lama dan segera mengalami pemulihan. Pemulihan tersebut terjadi mengingat bahwa sitokin yang menginduksi *switching* IgA pada mukosa usus dihasilkan dalam jumlah relatif tinggi dibanding dalam serum yang berpengaruh pada respon IgM maupun IgG. Sitokin seperti IL 5, IL 6 dan TGF $\beta$  merupakan induktor untuk sel plasma dalam berdeferensiasi mensekresikan IgA (Kim *et al*, 1998; Mestecky *et al*, 1999; Abbas *et al*, 2000). Lebih lanjut dinyatakan bahwa IL 5 dihasilkan sel Th<sub>2</sub> sedangkan IL 6 dan TGF $\beta$  dihasilkan oleh sel T, makrofag maupun sel epitel yang banyak ditemukan dipermukaan mukosa usus (Mestecky *et al*, 1999; Abbas *et al*,

2000). Kenyataan tersebut berimplikasi bahwa produksi IL 6 dan TGF $\beta$  yang berperan penting dalam induksi sekresi IgA oleh sel plasma akan tersedia relatif tinggi di mukosa usus dibanding sistemik sehingga peningkatan respon IgA dalam mukosa dapat segera terdeteksi dalam waktu satu minggu berikutnya (dua minggu setelah penggunaan ajuvan CT). Staats and Enis (1999) juga menyatakan bahwa penggunaan CT sebagai ajuvan akan dapat meningkatkan respon IgA secara nyata dalam mukosa usus. Hal tersebut terbukti pada hasil penelitian ini yang menunjukkan pada minggu kedua sampai keempat respon IgA tetap terdeteksi dengan kecenderungan penurunan yang relatif perlahan (Gambar 5.1 dan 5.2). Penggunaan ajuvan CT juga akan mempertahankan respon IgA spesifik terhadap SPTAg yang akan tetap lebih tinggi dibanding dengan perlakuan imunisasi intranasal tanpa ajuvan pada minggu minggu selanjutnya seperti dilaporkan Subekti dan Arrasyid (2002).

Hasil penelitian ini secara umum memperlihatkan bahwa penggunaan ajuvan CT meskipun diaplikasikan secara intranasal tetap mampu menginduksi peningkatan dan perubahan profil respon imun IgA yang lebih baik dibanding imunisasi intranasal menggunakan SPTAg tanpa ajuvan. Penelitian lain yang dilaporkan oleh Debard *et al* (1996) memperlihatkan hasil serupa dalam induksi respon imun IgA meskipun antigen yang digunakan berbeda. IgA merupakan imunoglobulin utama yang berperan penting dalam respon imun adaptif pada mukosa usus. IgA dapat berinteraksi secara sinergis dan aditif dengan lapisan mukus pada mukosa usus untuk menetralkan mikroorganisme infeksius yang masuk ke dalam tubuh melalui saluran pencernaan. Adanya peningkatan respon imun IgA dan kemampuan mempertahankannya dalam jangka waktu lebih lama

diharapkan akan memberikan proteksi awal yang akan mereduksi dan mencegah serta mengeliminasi kemungkinan masuknya mikroorganisme ke sistem sirkulasi.



## **BAB 7**

### **PENUTUP**

#### **7.1 Kesimpulan**

Dari hasil dan analisis penelitian ini, dapat disimpulkan sebagai berikut :

1. Imunisasi menggunakan SPTAg tanpa ajuvan CT dan SPTAg dengan ajuvan CT yang diaplikasikan intranasal dapat meningkatkan respon imun IgA dibandingkan dengan kontrol (PBS).
2. Waktu pengamatan berpengaruh terhadap IgA mukosa usus akibat pemberian SPTAg dan SPTAg dengan ajuvan CT yang diaplikasikan intranasal.
3. Terdapat interaksi antara waktu pengamatan dengan perlakuan terhadap peningkatan IgA mukosa usus.

#### **7.2 Saran**

1. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut dengan menggunakan jenis protein *T. gondii* yang berbeda.
2. Perlunya variabel lain yaitu kadar beberapa sitokin seperti IL 4, IL5, IL6, IL13, IL 12, IFN $\gamma$  maupun TGF $\beta$  untuk menunjang pengungkapan yang lebih rinci terhadap perbedaan dan perubahan profil respon imun yang diinduksi oleh ajuvan CT

## DAFTAR PUSTAKA

- Abbas, AK, Lichtman AH, Pober JS, 2000. *Cellular and Molecular Immunology*. Philadelphia: W.B. Saunders Company, pp 456-521.
- Aubert D, Maine GT, Villena I, Hunt JC, Howard L, Sheu M, Brojanac S, Chovan LE, Nowlan SF, Pinon JM, 2000. Recombinant Antigens to Detect *Toxoplasma gondii* Specific Immunoglobulin G and Immunoglobulin M in Human Sera by Enzyme Immunoassay. *J. Clin. Microbiol.* Vol. 38, No. 3: 1144-1150.
- Alexander, J, Jebbari H, Bluethmann H, Satoskar A, Roberts CW. 1996. Immunological Control of *Toxoplasma gondii* and Appropriate Vaccine Design. In (Gross, Ed). *Toxoplasma gondii*. Berlin: Springer – Verlag, pp 183 – 195.
- Bioschi, 2003. More on *Toxoplasma gondii*. [http://www.bioschi.ohio-state.edu/parasite/more\\_toxoplasma.html](http://www.bioschi.ohio-state.edu/parasite/more_toxoplasma.html). 12 Februari 2004. 11.00 wib
- Barackman JD, Ott G, O'Hagan DT, 1999. Intranasal immunization of mice with influenza vaccine in combination with the adjuvant LT-R72 induces potent mucosal and serum immunity which is stronger than that with traditional intramuscular immunization. *Infect. Immun* 67: 4276 – 4279.
- Black MW, Boothroyd JC. 2000. Lytic cycle of *Toxoplasma gondii*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev* 6 : 607 – 623.
- Bonenfant CI, Dimier – Poisson, Velge F – Roussel D, Buzoni – Gatel G, Del Giudice, Rappuoli R, Bout D. 2001. Intranasal immunization with SAG1 and non toxic mutant Heat Labile Enterotoxins protects mice against *Toxoplasma gondii*. *Infect. Immun* 69: 1605 -- 1612.
- Bourguin I, Moser M, Buzoni – Gatel D, Ticlemans F, Bout D, Urbain J, Leo O, 1998. Murine dendritic cells pulsed in vitro with *Toxoplasma gondii* antigens induce protective immunity in vivo . *Infect. Immun* 66: 4867 - 4874.
- Bowman CC, Clements JD, 2001. Differential biological and adjuvant activities of Cholera Toxin and *Escherichia coli* Heat Labile Enterotoxin hybrids. *Infect. Immun* 6: 1528 – 1535.
- Brandtzaeg P, 1994. Distribution and characteristics of mucosal immunoglobulin – producing cells. In (Ogra Pl., Lamm ME, McGhee JR, Mestecky J,

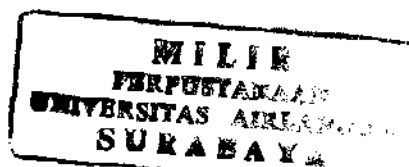


- Strober W, Bienenstock J, eds). *Handbook of Mucosal Immunology*, San Diego: Academic Press, pp 251–262.
- Braun MC, Jianping HE, Wu CY, Kelsall BL, 1999. Cholera toxin suppresses interleukin (IL) – 12 production and IL – 12 receptor  $\beta$ 1 and  $\beta$ 2 chain expression. *J. Exp. Med* 18: 541–552.
- Channon JY, Seguin RM, Kasper LH, 2000. Differential infectivity and division of *Toxoplasma gondii* in human peripheral blood leukocytes. *Infect Immun* 68 : 4822-4826.
- Ceravolo IP, Chaves ACL, Bonjardim CA, Sibley D, Romanha AJ, Gazzinelli RT, 1999. Replication of *Toxoplasma gondii*, but not *Trypanozoma cruzi*, is regulated in human fibroblast activated with gamma interferons: requirement of functional JAK/STAT pathway. *Infect Immun* 67: 2233 – 2340.
- Cesbron – Delauw MF, Lecordier , Mercier C, 1996. Role of secretory dense granule organelles in the pathogenesis of toxoplasmosis. In (Gross, Ed) *Toxoplasma gondii*. Berlin : Springer – Verlag, pp 59 – 65
- Darcy F, Santoro F, 1994. Toxoplasmosis. In (Kierszenbaum F). *Parasitic infection and the immune system..* London: Academic Press, pp 163 – 201.
- Debard ND, Buzoni-Gatel, Bout D. 1996. Intranasal immunization with SAG1 protein of *Toxoplasma gondii* in association with cholera toxin dramatically reduces development of cerebral cysts after oral infection. *Infect Immun*, 64: 2158 - 2166.
- Denkers EY, and Gazzinelli RT, 1998. Regulation and function of T – cell – mediated immunity during *Toxoplasma gondii* infection. *Clin Microbiol Rev* 11:267-299
- Douce G, Fontana, Pizza M, Rappuoli R, Dougan R. 1997. Intranasal immunogenicity and adjuvanticity of site – directed mutant derivatives of cholera toxin. *Infect Immun*, 65:2821– 2828.
- Dubey JP, Lindsay DS, Speer, CA, 1998. Structures of *Toxoplasma gondii* tachyzoites, bradyzoites and sporozoites and biology and development of tissue. *Clin Microbiol Rev* 11: 267 – 299.
- Dubey JP, 1999. *Toxoplasma gondii*. <http://www.mcdimicrochapter84.htm/11> . 11 November 2003. 13.10 wib.
- Elgert KD, 1996. *Immunology*. New York: John Wiley and Sons Inc, pp 256 – 311.

- Elson CO, Dertzbaugh MT, 1994. Mucosal adjuvant. In (Ogra, PL, Lamm ME, McGhee JR, Mestecky J, Strober W, Bienenstock J, eds). *Handbook of Mucosal Immunology*. San Diego: Academic Press, pp 391-402.
- Fisher HG, Reichman G, Hadding U. 1996. *Toxoplasma* proteins recognized by protective T lymphocytes. In (Gross, ed). *Toxoplasma gondii*. Berlin: Berlin: Spriger-Verlag, pp. 55 – 58.
- Fourmaux, MN, Garcia Reguet N, Mercereau – Pujalon O, Dubremetz JF., 1996. *Toxoplasma gondii* micronema proteins: gene cloning and Possible Function. In (Gross, ed) *Toxoplasma gondii*. Berlin: Spriger-Verlag, pp. 55 – 58.
- Fukuta S, Magnani JL, Twiddy EM, Holmes RK, Ginsburg V. 1988. Comparison of the carbohydrate-binding specificities of cholera toxin and *Escherichia coli* heat-labile enterotoxins LTh-I, LT-IIa, and LT-IIb. *Infect Immun* 56: 1748 – 1753.
- Gandahusada S, 2000. *Toxoplasma gondii*. dalam (Gandahusada, Iahude IHH, Pribadi W). *Parasitologi Kedokteran*, edisi 3. Jakarta: FKUI, hlm 153 – 16.
- George Chandy AK, Eriksson M, Lebens I, Nordström E, Schön, Holmgren J, 2001. Cholera toxin B subunit as a carrier molecule promotes antigen presentation and increases CD40 and CD86 expression on antigen-presenting cells. *Infect Immun* 69:5716 – 5725.
- Haumont ML, Delhayel, Garcia M, Jurado P, Mazzu V, Daminet V, Verlant A, Bollen R, Biemans R and Jacquet A. 2000. Protective immunity against congenital toxoplasmosis with recombinant SAG1 protein in a guinea pig model. *Infect Immun* 68: 4948 – 4953.
- Holliman RE, 1996. Toxoplasmosis. dalam (Cook G, eds). *Manson's Tropical Diseases*, 20<sup>th</sup> ed. London: ELBS – W.B. Saunders, pp 374-436.
- Kasper LH, Buzoni – Gatel D, 2001. Ups and down of mucosal cellular immunity against protozoan parasites. *Infect Immun* 69: 1–8.
- Killian M, Russel MW, 1994. Function of Mucosal Immunoglobulins. In (Ogra PL, Lamm ME, McGhee JR, Mestecky J, Strober W Bienenstock J, eds). *Handbook of Mucosal Immunology*. San Diego: Academic Press, pp 127 – 140.
- Kim PL, Eckmann WJ, Lee W, Han, Kagnoff MF, 1998. Cholera Toxin and Cholera Toxin B Subunit induce IgA switching through the action of TGFb1, *J Immunol* 160: 1198-1203.
- Jacobs D, Vercammen M, Saman E, 1999. Evaluation of recombinant dense granule antigen 7 (GRA7) of *Toxoplasma gondii* for detection of

- immunoglobulin G antibodies and analysis of a major antigenic domain. *Clin Diagn Lab Immunol* 6: 24 – 29.
- Levine ND, 1985. *Protozoologi Veteriner*. Yogyakarta: UGM Press.
- Lamenschow S, Hosmer DW, Klar J, Lwanga KS, 1990. Adequacy sample size in health studies. New York: John Willey and Sons.
- Martin M, Metzger DJ, Michalek SM, Connell TD, Russell MW, 2000. Comparative analysis of the mucosal adjuvanticity of the type II heat – labile enterotoxin LT – IIa and LT – IIb. *Infect Immun* 68: 281 – 287.
- McLeod RD, Mack, Brown C, 1991. *Toxoplasma gondii* – new advances in cellular and molecular biology. *Exp Parasitol* 72: 109 – 121.
- Mestecky J, Russell MW, Elson CO, 1999. Intestinal IgA : Novel views on its function in the defence of the largest mucosal surfaces. *Gut* 44: 2-5.
- Millar DG, Hirst TR, Snider DP, 2001. *Escherichia coli* heat – labile enterotoxin B subunit is a more potent mucosal adjuvant than its closely related homologue, the B subunit of cholera toxin. *Infect Immun* 69: 3476 – 3482.
- Prigione I, Facchetti P, Lecordier L, Deslee D, Chiesa S, Cesbron – Delauw M, Pistoia V, 2000. T cell clones raised from chronically infected healthy humans by stimulation with *Toxoplasma gondii* excretory–secretory antigens cross-react with live tachyzoites: characterization of the fine antigenic specificity of the clones and implications for vaccine development. *J Immunol* 164: 3741 – 3748.
- Rappuoli RM, Pizza G, Douce, Dougan G, 1999. Structure and mucosal adjuvanticity of cholera and *Escherichia coli* heat – labile enterotoxins. *Immunol. Today* 20: 493 – 500.
- Robert LS, Janovy J, 2000. *Foundations of Parasitology*. Boston : McGraw Hill, pp 127 – 132.
- Sayles PC, Gibson GW, Johnson I.L, 2000. B cells are essential for vaccination-induced resistance to virulent *Toxoplasma gondii*. *Infect. immune* 68: 1026-1033.
- Scars CL, Kaper JB, 1996. Enteric bacterial toxins: mechanisms of action and linkage to intestinal secretion. *Microbiol. Rev* 60: 167 – 215.
- Sminia T, Kraal G, 1999. Nasal-Associated Lymphoid Tissue. In (Ogra PL, Lamm ME, McGhee JR, Mestecky J, Strober W, Bienenstock J, eds). *Handbook of Mucosal Immunology*. San Diego: Academic Press, pp 357-364.

- Smith JL, 1999. Foodborne infections during pregnancy. *J Food Protect* 62: 818 – 829.
- Soedarto, 1995. *Protozoologi Kedokteran*, edisi 3. Jakarta: Widya Medika, hlm 105 –106.
- Staats HF, Ennis FA, 1999. IL 1 an Effective Adjuvant for Mucosal and Systemic Immune Response when Coadministered with Protein Immunogens. *J Immunol* 162: 6141-6147.
- Subekti DT, Arrasyid NK, 2002. Respon imun humoral sistemik dan mukosal pada permukaan saluran usus halus mencit setelah vaksinasi intranasal menggunakan protein solubel *Toxoplasma gondii* dengan ajuvan toksin kolera dan enterotoksin tidak tahan panas tipe I. *Imunologi dan Biologi Molekuler*, Pusat Ilmu Kedokteran Tropis Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta
- Susanto LS, Gandahusada, Muljono R, 1999. Invasi *Toxoplasma gondii* ke dalam sel hospes serta diferensiasinya dari takizoit ke bradizoit. *Maj Ked Ind* 49: 208 – 211.
- Tomavo S, 1996. The major surface proteins of *Toxoplasma gondii*: structures and functions. In (Gross, ed). *Toxoplasma gondii*. Berlin: Springer-Verlag, pp 45 – 54.
- Torrie JH, 1989. Prinsip dan prosedur statistika: Suatu Pendekatan Biometrik (Bambang Sumantri, penterjemah), Jakarta: Gramedia, hlm 403 – 425.
- Underdown BJ, Mestecky J, 1994. Mucosal Immunoglobulins. In (Ogra PL, Lamm ME, McGhee JR, Mestecky J, Strober W, Bienenstock J, eds). *Handbook of mucosal immunology*. San Diego: Academic Press, pp 79 – 98.
- Paul M, 1999. Immunoglobulin G avidity in diagnosis toxoplasmic lymphadenopathy and ocular toxoplasmosis. *Clin Diag Lab Immunol* 6: 514-518.
- Velge-Roussel F, Marcelo P, Lepage AC, Buzoni – Gatel D, Bout DT, 2000. Intranasal immunization with *Toxoplasma gondii* SAG1 induces protective cell into both NALT and GALT compartments. *Infect Immun* 68: 969 – 972.
- Vercammen MI, Scorza K, Huygen J, De Braekeleer R, Diet D, Jacobs E, Saman Verschuere H, 2000. DNA vaccination with genes encoding *Toxoplasma gondii* antigens GRA1, GRA7, and ROP2 induces partially protective immunity against lethal challenge in mice. *Infect Immun* 68:38 – 45.



- Williams, N.A., T.R. Hirst and T.O. Nashar. 1999. Immune modulation by the cholera – like enterotoxins: from adjuvant to therapeutic. *Immunol Today* 20: 95 – 101.
- Wimer – Mackin S, Holmes RK, Wolf AA, Lencer WI, Jobling MG, 2001. Characterization of receptor-mediated signal transduction by *Escherichia coli* type IIa heat-labile enterotoxin in the polarized human intestinal cell line T84. *Infect Immun* 69: 7205 – 7212.
- Yamamoto MH, Kiyono S, Yamamoto E, Batanero MN, Kweon S, Otake M, Azuma Y, Takeda, McGhee JR, 1999. Direct effects on antigen-presenting cell and T lymphocytes explain the Adjuvanticity of nontoxic cholera toxin mutant. *J Immunol* 162 : 7015-7021.
- Yap GS, Scharton – Kersten DJP, Ferguson D, Howe D, Suzuki Y, Sher A, 1998. Partially protective vaccination permits the development of latency in a normal virulent strain of *Toxoplasma gondii*. *Infect immune* 67: 4382-4388.
- Yun, C.H., H.S. Lillehoj and E.P. Lillehoj. 2000. Intestinal immune responses to coccidiosis. *Develop Comp Immunol* 24 : 303 – 324.
- Zainuddin M. 2001. *Metodologi Penelitian*. Surabaya : Program Pasca sarjana Unair



## Lampiran 1a

## Means

## Optical Density IgA \* Waktu Pengamatan (Minggu)

Optical Density IgA			
Waktu Pengamatan	Mean	Std. Deviation	N
Minggu I	.45764	.16716	12
Minggu II	.45383	.13002	12
Minggu III	.44742	.17888	12
Minggu IV	.40492	.14258	12
Total	.44095	.15231	48

## Optical Density IgA \* Perlakuan (Antigen)

Optical Density IgA			
Perlakuan (Antigen)	Mean	Std. Deviation	N
PBS	.30469	5.9315E-02	16
Ag	.48410	.12893	16
AgCT	.53406	.14666	16
Total	.44095	.15231	48

## UJI NORMALITAS DISTRIBUSI DATA

Waktu Pengamatan (Minggu) = Minggu I, Perlakuan (Antigen) = PBS

## One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		Optical Density IgA
N		4
Normal Parameters <sup>a,b</sup>	Mean	.31725
	Std. Deviation	6.1835E-02
Most Extreme Differences	Absolute	.438
	Positive	.438
	Negative	-.307
Kolmogorov-Smirnov Z		.875
Asymp. Sig. (2-tailed)		.428

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

c. Waktu Pengamatan (Minggu) = Minggu I, Perlakuan (Antigen) = PBS

## Lampiran 1b

**Waktu Pengamatan (Minggu) = Minggu I, Perlakuan (Antigen) = Ag****One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test**

		Optical Density IgA
N		4
Normal Parameters <sup>a,b</sup>	Mean	.66967
	Std. Deviation	2.6612E-02
Most Extreme Differences	Absolute	.250
	Positive	.250
	Negative	-.164
Kolmogorov-Smirnov Z		.500
Asymp. Sig. (2-tailed)		.964

- a. Test distribution is Normal.  
 b. Calculated from data.  
 c. Waktu Pengamatan (Minggu) = Minggu I, Perlakuan (Antigen) = Ag

**Waktu Pengamatan (Minggu) = Minggu I, Perlakuan (Antigen) = AgCT****One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test**

		Optical Density IgA
N		4
Normal Parameters <sup>a,b</sup>	Mean	.38600
	Std. Deviation	6.9690E-02
Most Extreme Differences	Absolute	.318
	Positive	.318
	Negative	-.179
Kolmogorov-Smirnov Z		.637
Asymp. Sig. (2-tailed)		.812

- a. Test distribution is Normal.  
 b. Calculated from data.  
 c. Waktu Pengamatan (Minggu) = Minggu I, Perlakuan (Antigen) = AgCT



## Lampiran 1c

**Waktu Pengamatan (Minggu) = Minggu II, Perlakuan (Antigen) = PBS****One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test**

		Optical Density IgA
N		4
Normal Parameters <sup>a,b</sup>	Mean	.30000
	Std. Deviation	7.5348E-02
Most Extreme Differences	Absolute	.324
	Positive	.324
	Negative	-.229
Kolmogorov-Smirnov Z		.647
Asymp. Sig. (2-tailed)		.796

- a. Test distribution is Normal.  
 b. Calculated from data.  
 c. Waktu Pengamatan (Minggu) = Minggu II, Perlakuan (Antigen) = PBS

**Waktu Pengamatan (Minggu) = Minggu II, Perlakuan (Antigen) = Ag****One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test**

		Optical Density IgA
N		4
Normal Parameters <sup>a,b</sup>	Mean	.49450
	Std. Deviation	6.3380E-02
Most Extreme Differences	Absolute	.203
	Positive	.203
	Negative	-.156
Kolmogorov-Smirnov Z		.406
Asymp. Sig. (2-tailed)		.997

- a. Test distribution is Normal.  
 b. Calculated from data.  
 c. Waktu Pengamatan (Minggu) = Minggu II, Perlakuan (Antigen) = Ag

## Lampiran 1d

**Waktu Pengamatan (Minggu) = Minggu II, Perlakuan (Antigen) = AgCT****One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test**

		Optical Density IgA
N		4
Normal Parameters <sup>a,b</sup>	Mean	.56700
	Std. Deviation	3.8192E-02
Most Extreme Differences	Absolute	.252
	Positive	.252
	Negative	-.232
Kolmogorov-Smirnov Z		.504
Asymp. Sig. (2-tailed)		.961

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

c. Waktu Pengamatan (Minggu) = Minggu II, Perlakuan (Antigen) = AgCT

**Waktu Pengamatan (Minggu) = Minggu III, Perlakuan (Antigen) = PBS****One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test**

		Optical Density IgA
N		4
Normal Parameters <sup>a,b</sup>	Mean	.30600
	Std. Deviation	5.8029E-02
Most Extreme Differences	Absolute	.378
	Positive	.378
	Negative	-.214
Kolmogorov-Smirnov Z		.757
Asymp. Sig. (2-tailed)		.616

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

c. Waktu Pengamatan (Minggu) = Minggu III, Perlakuan (Antigen) = PBS

## Lampiran 1e

**Waktu Pengamatan (Minggu) = Minggu III, Perlakuan (Antigen) = Ag****One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test**

		Optical Density IgA
N		4
Normal Parameters <sup>a,b</sup>	Mean	.40400
	Std. Deviation	2.6994E-02
Most Extreme Differences	Absolute	.248
	Positive	.177
	Negative	-.248
Kolmogorov-Smirnov Z		.495
Asymp. Sig. (2-tailed)		.967

- a. Test distribution is Normal.  
 b. Calculated from data.  
 c. Waktu Pengamatan (Minggu) = Minggu III, Perlakuan (Antigen) = Ag

**Waktu Pengamatan (Minggu) = Minggu III, Perlakuan (Antigen) = AgCT****One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test**

		Optical Density IgA
N		4
Normal Parameters <sup>a,b</sup>	Mean	.63225
	Std. Deviation	.19622
Most Extreme Differences	Absolute	.233
	Positive	.233
	Negative	-.221
Kolmogorov-Smirnov Z		.467
Asymp. Sig. (2-tailed)		.981

- a. Test distribution is Normal.  
 b. Calculated from data.  
 c. Waktu Pengamatan (Minggu) = Minggu III, Perlakuan (Antigen) = AgCT

## Lampiran 1f

**Waktu Pengamatan (Minggu) = Minggu IV, Perlakuan (Antigen) = PBS****One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test**

		Optical Density IgA
N		4
Normal Parameters <sup>a,b</sup>	Mean	.29550
	Std. Deviation	6.8093E-02
Most Extreme Differences	Absolute	.301
	Positive	.301
	Negative	-.218
Kolmogorov-Smirnov Z		.602
Asymp. Sig. (2-tailed)		.861

- a. Test distribution is Normal.  
 b. Calculated from data.  
 c. Waktu Pengamatan (Minggu) = Minggu IV, Perlakuan (Antigen) = PBS

**Waktu Pengamatan (Minggu) = Minggu IV, Perlakuan (Antigen) = Ag****One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test**

		Optical Density IgA
N		4
Normal Parameters <sup>a,b</sup>	Mean	.36825
	Std. Deviation	7.1785E-02
Most Extreme Differences	Absolute	.188
	Positive	.188
	Negative	-.144
Kolmogorov-Smirnov Z		.377
Asymp. Sig. (2-tailed)		.999

- a. Test distribution is Normal.  
 b. Calculated from data.  
 c. Waktu Pengamatan (Minggu) = Minggu IV, Perlakuan (Antigen) = Ag

## Lampiran 1g

**Waktu Pengamatan (Minggu) = Minggu IV, Perlakuan (Antigen) = AgCT****One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test**

		Optical Density IgA
N		4
Normal Parameters <sup>a,b</sup>	Mean	.55100
	Std. Deviation	.13718
Most Extreme Differences	Absolute	.269
	Positive	.269
	Negative	-.227
Kolmogorov-Smirnov Z		.538
Asymp. Sig. (2-tailed)		.934

- a. Test distribution is Normal.
- b. Calculated from data.
- c. Waktu Pengamatan (Minggu) = Minggu IV, Perlakuan (Antigen) = AgCT



## Lampiran 2

## Univariate Analysis of Variance

## Between-Subjects Factors

		Value Label	N
Waktu Pengamatan (Minggu)	1	Minggu I	12
	2	Minggu II	12
	3	Minggu III	12
	4	Minggu IV	12
Perlakuan (Antigen)	0	PBS	16
	1	Ag	16
	2	AgCT	16

## Descriptive Statistics

Dependent Variable: Optical Density IgA

Waktu Pengamatan	Perlakuan (Antigen)	Mean	Std. Deviation	N
Minggu I	PBS	.31725	6.1835E-02	4
	Ag	.66967	2.6612E-02	4
	AgCT	.38600	6.9690E-02	4
	Total	.45764	.16716	12
Minggu II	PBS	.30000	7.5348E-02	4
	Ag	.49450	6.3380E-02	4
	AgCT	.56700	3.8192E-02	4
	Total	.45383	.13002	12
Minggu III	PBS	.30600	5.8029E-02	4
	Ag	.40400	2.6994E-02	4
	AgCT	.63225	.19622	4
	Total	.44742	.17888	12
Minggu IV	PBS	.29550	6.6093E-02	4
	Ag	.36825	7.1765E-02	4
	AgCT	.55100	.13718	4
	Total	.40492	.14258	12
Total	PBS	.30469	5.9315E-02	16
	Ag	.48410	.12893	16
	AgCT	.53406	.14666	16
	Total	.44095	.15231	48

## Lampiran 3

## Uji Anava faktorial

## Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: Optical Density IgA

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	.816 <sup>a</sup>	11	7.417E-02	9.731	.000
Intercept	9.333	1	9.333	1224.35	.000
TIME	2.142E-02	3	7.139E-03	.937	.433
TRIAL	.466	2	.233	30.539	.000
TIME * TRIAL	.329	6	5.482E-02	7.191	.000
Error	.274	36	7.623E-03		
Total	10.423	48			
Corrected Total	1.090	47			

a. R Squared = .748 (Adjusted R Squared = .671)



## Lampiran 4a

## Estimated Marginal Means

### 1. Waktu Pengamatan (Minggu)

#### Estimates

Dependent Variable: Optical Density IgA

Waktu Pengamatan (Minggu)	Mean	Std. Error
Minggu I	.458	.025
Minggu II	.454	.025
Minggu III	.447	.025
Minggu IV	.405	.025

#### Pairwise Comparisons

Dependent Variable: Optical Density IgA

(I) Waktu Pengamatan (Minggu)	(J) Waktu Pengamatan (Minggu)	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig. <sup>a</sup>
Minggu I	Minggu II	3.806E-03	.036	.916
	Minggu III	1.022E-02	.036	.776
	Minggu IV	5.272E-02	.036	.148
Minggu II	Minggu III	6.417E-03	.036	.858
	Minggu IV	4.892E-02	.036	.178
Minggu III	Minggu IV	4.250E-02	.036	.241

Based on estimated marginal means

- a. Adjustment for multiple comparisons: Least Significant Difference (equivalent to no adjustments).

#### Univariate Tests

Dependent Variable: Optical Density IgA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Contrast	2.142E-02	3	7.139E-03	.937	.433
Error	.274	36	7.623E-03		

The F tests the effect of Waktu Pengamatan (Minggu). This test is based on the linearly independent pairwise comparisons among the estimated marginal means.



## Lampiran 4b

## 2. Perlakuan (Antigen)

## Estimates

Dependent Variable: Optical Density IgA

Perlakuan (Antigen)	Mean	Std. Error
PBS	.305	.022
Ag	.484	.022
AgCT	.534	.022

## Pairwise Comparisons

Dependent Variable: Optical Density IgA

(I) Perlakuan (Antigen)	(J) Perlakuan (Antigen)	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig. <sup>a</sup>
PBS	Ag	-.179	.031	.000
	AgCT	-.229	.031	.000
Ag	AgCT	-4.996E-02	.031	.114

Based on estimated marginal means

- a. Adjustment for multiple comparisons: Least Significant Difference (equivalent to no adjustments).

## Univariate Tests

Dependent Variable: Optical Density IgA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Contrast	.466	2	.233	30.539	.000
Error	274	36	7.623E-03		

The F tests the effect of Perlakuan (Antigen). This test is based on the linearly independent pairwise comparisons among the estimated marginal means.

**Lampiran 4c**  
**Post Hoc Tests**

**Pengaruh Kombinasi Waktu\*Antigen**

**Multiple Comparisons**

Dependent Variable: Optical Density IgA

LSD

(I) LSD	(J) LSD	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
Minggu I*PBS	Minggu I*PBS			...		
	Minggu I*Ag	-.352417*	.061737	.000	-.47762	-.22721
	Minggu I*AgCT	-.068750	.061737	.273	-.19396	.05646
	Minggu II*PBS	.017250	.061737	.782	-.10796	.14246
	Minggu II*Ag	-.177250*	.061737	.007	-.30246	-.05204
	Minggu II*AgCT	-.249750*	.061737	.000	-.37496	-.12454
	Minggu III*PBS	.011250	.061737	.856	-.11396	.13646
	Minggu III*Ag	-.086750	.061737	.169	-.21196	.03846
	Minggu III*AgCT	-.315000*	.061737	.000	-.44021	-.18979
	Minggu IV*PBS	.021750	.061737	.727	-.10346	.14696
	Minggu IV*Ag	-.051000	.061737	.414	-.17621	.07421
	Minggu IV*AgCT	-.233750*	.061737	.001	-.35896	-.10854
Minggu I*Ag	Minggu I*PBS	.352417*	.061737	.000	.22721	.47762
	Minggu I*Ag					
	Minggu I*AgCT	.283667*	.061737	.000	.15846	.40887
	Minggu II*PBS	.369667*	.061737	.000	.24446	.49487
	Minggu II*Ag	.175167*	.061737	.007	.04996	.30037
	Minggu II*AgCT	-.102667	.061737	.105	-.02254	.22787
	Minggu III*PBS	.363667*	.061737	.000	.23846	.48887
	Minggu III*Ag	.265667*	.061737	.000	.14046	.39087
	Minggu III*AgCT	.037417	.061737	.548	-.08779	.16262
	Minggu IV*PBS	.374167*	.061737	.000	.24896	.49937
	Minggu IV*Ag	.301417*	.061737	.000	.17621	.42662
	Minggu IV*AgCT	.118667	.061737	.063	-.00654	.24387
Minggu I*AgCT	Minggu I*PBS	-.068750	.061737	.273	-.05646	.19396
	Minggu I*Ag	-.283667*	.061737	.000	-.40887	-.15846
	Minggu I*AgCT					
	Minggu II*PBS	.086000	.061737	.172	-.03921	.21121
	Minggu II*Ag	-.108500	.061737	.087	-.23371	.01671
	Minggu II*AgCT	-.181000*	.061737	.006	-.30621	-.05579
	Minggu III*PBS	.080000	.061737	.203	-.04521	.20521
	Minggu III*Ag	-.018000	.061737	.772	-.14321	.10721
	Minggu III*AgCT	-.246250*	.061737	.000	-.37146	-.12104
	Minggu IV*PBS	.090500	.061737	.151	-.03471	.21571
	Minggu IV*Ag	.017750	.061737	.775	-.10746	.14296
	Minggu IV*AgCT	-.165000*	.061737	.011	-.29021	-.03979

## Lampiran 4d

## Multiple Comparisons

Dependent Variable: Optical Density IgA

LSD

(I) LSD	(J) LSD	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
Minggu II*PBS	Minggu I*PBS	-.017250	.061737	.782	-.14246	.10796
	Minggu I*Ag	-.369667*	.061737	.000	-.49487	-.24446
	Minggu I*AgCT	-.086000	.061737	.172	-.21121	.03921
	Minggu II*PBS					
	Minggu II*Ag	-.194500*	.061737	.003	-.31971	-.06929
	Minggu II*AgCT	-.267000*	.061737	.000	-.39221	-.14179
	Minggu III*PBS	-.006000	.061737	.923	-.13121	.11921
	Minggu III*Ag	-.104000	.061737	.101	-.22921	.02121
	Minggu III*AgCT	-.332250*	.061737	.000	-.45746	-.20704
	Minggu IV*PBS	.004500	.061737	.942	-.12071	.12971
	Minggu IV*Ag	-.068250	.061737	.276	-.19346	.05696
	Minggu IV*AgCT	-.251000*	.061737	.000	-.37621	-.12579
	Minggu II*Ag	Minggu I*PBS	.177250*	.061737	.007	.05204
Minggu I*Ag		-.175167*	.061737	.007	-.30037	-.04996
Minggu I*AgCT		.108500	.061737	.087	-.01671	.23371
Minggu II*PBS		.194500*	.061737	.003	.06929	.31971
Minggu II*Ag						
Minggu II*AgCT		-.072500	.061737	.248	-.19771	.05271
Minggu III*PBS		.188500*	.061737	.004	.06329	.31371
Minggu III*Ag		.090500	.061737	.151	-.03471	.21571
Minggu III*AgCT		-.137750*	.061737	.032	-.26296	-.01254
Minggu IV*PBS		.199000*	.061737	.003	.07379	.32421
Minggu IV*Ag		.126250*	.061737	.048	.00104	.25146
Minggu IV*AgCT		-.056500	.061737	.366	-.18171	.06871
Minggu II*AgCT		Minggu I*PBS	.249750*	.061737	.000	.12454
	Minggu I*Ag	-.102667	.061737	.105	-.22787	.02254
	Minggu I*AgCT	.181000*	.061737	.006	.05579	.30621
	Minggu II*PBS	.267000*	.061737	.000	.14179	.39221
	Minggu II*Ag	.072500	.061737	.248	-.05271	.19771
	Minggu II*AgCT					
	Minggu III*PBS	.261000*	.061737	.000	.13579	.38621
	Minggu III*Ag	.163000*	.061737	.012	.03779	.28821
	Minggu III*AgCT	-.065250	.061737	.298	-.19046	.05996
	Minggu IV*PBS	.271500*	.061737	.000	.14629	.39671
	Minggu IV*Ag	.198750*	.061737	.003	.07354	.32396
	Minggu IV*AgCT	.016000	.061737	.797	-.10921	.14121

## Lampiran 4e

## Multiple Comparisons

Dependent Variable: Optical Density IgA

LSD

(I) LSD	(J) LSD	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
Minggu III*PBS	Minggu I*PBS	-.011250	.061737	.856	-.13646	.11396
	Minggu I*Ag	-.363667*	.061737	.000	-.48887	-.23846
	Minggu I*AgCT	-.080000	.061737	.203	-.20521	.04521
	Minggu II*PBS	.006000	.061737	.923	-.11921	.13121
	Minggu II*Ag	-.188500*	.061737	.004	-.31371	-.06329
	Minggu II*AgCT	-.261000*	.061737	.000	-.38621	-.13579
	Minggu III*PBS					
	Minggu III*Ag	-.098000	.061737	.121	-.22321	.02721
	Minggu III*AgCT	-.326250*	.061737	.000	-.45146	-.20104
	Minggu IV*PBS	.010500	.061737	.866	-.11471	.13571
	Minggu IV*Ag	-.062250	.061737	.320	-.18746	.06296
	Minggu IV*AgCT	-.245000*	.061737	.000	-.37021	-.11979
	Minggu III*Ag	Minggu I*PBS	.086750	.061737	.169	-.03846
Minggu I*Ag		-.265667*	.061737	.000	-.39087	-.14046
Minggu I*AgCT		.018000	.061737	.772	-.10721	.14321
Minggu II*PBS		.104000	.061737	.101	-.02121	.22921
Minggu II*Ag		-.090500	.061737	.151	-.21571	.03471
Minggu II*AgCT		-.163000*	.061737	.012	-.28821	-.03779
Minggu III*PBS		.098000	.061737	.121	-.02721	.22321
Minggu III*Ag						
Minggu III*AgCT		-.228250*	.061737	.001	-.35346	-.10304
Minggu IV*PBS		.108500	.061737	.087	-.01671	.23371
Minggu IV*Ag		.035750	.061737	.566	-.08946	.16096
Minggu IV*AgCT	-.147000*	.061737	.023	-.27221	-.02179	
Minggu III*AgCT	Minggu I*PBS	.315000*	.061737	.000	.18979	.44021
	Minggu I*Ag	-.037417	.061737	.548	-.16262	.08779
	Minggu I*AgCT	.246250*	.061737	.000	.12104	.37146
	Minggu II*PBS	.332250*	.061737	.000	.20704	.45746
	Minggu II*Ag	.137750*	.061737	.032	.01254	.26296
	Minggu II*AgCT	.065250	.061737	.298	-.05996	.19046
	Minggu III*PBS	.326250*	.061737	.000	.20104	.45146
	Minggu III*Ag	.228250*	.061737	.001	.10304	.35346
	Minggu III*AgCT					
	Minggu IV*PBS	.336750*	.061737	.000	.21154	.46196
	Minggu IV*Ag	.264000*	.061737	.000	.13879	.38921
Minggu IV*AgCT	.081250	.061737	.196	-.04396	.20646	



## Lampiran 4f

## Multiple Comparisons

Dependent Variable: Optical Density IgA  
LSD

(I) LSD	(J) LSD	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
Minggu IV*PBS	Minggu I*PBS	-.021750	.061737	.727	-.14696	.10346
	Minggu I*Ag	-.374167*	.061737	.000	-.49937	-.24896
	Minggu I*AgCT	-.090500	.061737	.151	-.21571	.03471
	Minggu II*PBS	-.004500	.061737	.942	-.12971	.12071
	Minggu II*Ag	-.199000*	.061737	.003	-.32421	-.07379
	Minggu II*AgCT	-.271500*	.061737	.000	-.39671	-.14629
	Minggu III*PBS	-.010500	.061737	.866	-.13571	.11471
	Minggu III*Ag	-.108500	.061737	.087	-.23371	.01671
	Minggu III*AgCT	-.336750*	.061737	.000	-.46196	-.21154
	Minggu IV*PBS					
	Minggu IV*Ag	-.072750	.061737	.246	-.19796	.05246
	Minggu IV*AgCT	-.255500*	.061737	.000	-.38071	-.13029
	Minggu IV*Ag	Minggu I*PBS	.051000	.061737	.414	-.07421
Minggu I*Ag		-.301417*	.061737	.000	-.42662	-.17621
Minggu I*AgCT		-.017750	.061737	.775	-.14296	.10746
Minggu II*PBS		.068250	.061737	.276	-.05696	.19346
Minggu II*Ag		-.126250*	.061737	.048	-.25146	-.00104
Minggu II*AgCT		-.198750*	.061737	.003	-.32396	-.07354
Minggu III*PBS		.062250	.061737	.320	-.06296	.18746
Minggu III*Ag		-.035750	.061737	.566	-.16096	.08946
Minggu III*AgCT		-.264000*	.061737	.000	-.38921	-.13879
Minggu IV*PBS		.072750	.061737	.246	-.05246	.19796
Minggu IV*Ag						
Minggu IV*AgCT		-.182750*	.061737	.005	-.30796	-.05754
Minggu IV*AgCT		Minggu I*PBS	.233750*	.061737	.001	.10854
	Minggu I*Ag	-.118667	.061737	.063	-.24387	.00634
	Minggu I*AgCT	.165000*	.061737	.011	.03979	.29021
	Minggu II*PBS	.251000*	.061737	.000	.12579	.37621
	Minggu II*Ag	.056500	.061737	.366	-.06871	.18171
	Minggu II*AgCT	-.016000	.061737	.797	-.14121	.10921
	Minggu III*PBS	.245000*	.061737	.000	.11979	.37021
	Minggu III*Ag	.147000*	.061737	.023	.02179	.27221
	Minggu III*AgCT	-.081250	.061737	.196	-.20646	.04396
	Minggu IV*PBS	.255500*	.061737	.000	.13029	.38071
	Minggu IV*Ag	.182750*	.061737	.005	.05754	.30796
	Minggu IV*AgCT					

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

Lampiran 5

Profile Plots

