

**MORTALITAS DAN PROFIL HEMATOLOGI MENCIT YANG DIINFEKSI
Trypanosoma evansi ISOLAT BANGKALAN, PEMALANG DAN PIDIE*
[Mortality and Haematology Profiles of Mice Infected with *Trypanosoma evansi* from
Bangkalan, Pemalang and Pidie Isolates]**

Didik T Subekti^{1,2✉}, Mutiara Febria¹, Febiola Rama Sari³, Indri N Hartiyati¹

¹ Fakultas Farmasi Universitas Pancasila, JL. Srengseng Sawah, Jagakarsa, Jakarta 12640,

² Balai Besar Penelitian Veteriner, JL. R.E. Martadinata 30, Bogor 16114,

³ Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Syiah Kuala, JL. Tgk. Hasan Krueng Kalee, Darussalam, Banda Aceh
email: subekti.vmd@lycos.com

ABSTRACT

Trypanosoma evansi known as trypanosomiasis causes or called surra in animals. Trypanosomiasis-associated death were generally due to severe anemia. Another report mentioned that a rapid death of mice can be attributed to the several reasons. One of those reasons is highly parasitaemia that leads to death of the host. However, there is another distinct report that high parasitemia in mice does not necessarily lead to anemia and clinical symptoms. This research was focused to study the relationship between trypanosomiasis-associated death with haematology profile, particularly the decrease of PCV (*packed cell volume*) value, anemia and virulence of *T. evansi* collected from several region of Indonesia. The experiments were performed by dividing mice into four groups. Three groups were infected by *T. evansi* according to the original isolates while another group were uninfected mice. Every two-day interval, all mice were observed their mortality and parasitaemia and also examined the PCV value and erythrocyte counts in peripheral blood. The experimental results shown that the degree of parasitemia in mice were not always related to mice mortality and anemia. Decreases of PCV value were related to the existence of parasitaemia but not with anemia. This study suggests that there is no relationship between the decreases of PCV value and anemia to the trypanosomiasis-associated death in mice.

Key words: *Trypanosoma evansi*, PCV value, anemia, mortality, virulence

ABSTRAK

Trypanosoma evansi telah diketahui sebagai penyebab trypanosomiasis atau surra pada hewan. Kematian hewan pada kasus trypanosomiasis umumnya disebabkan karena anemia yang berat. Laporan lain juga menyatakan bahwa kematian mencit yang cepat dapat berkaitan dengan beberapa hal, diantaranya adalah tingginya parasitemia. Namun demikian, laporan lain yang berbeda menyatakan bahwa mencit yang mengalami parasitemia tinggi tidak selalu menyebabkan anemia dan gejala klinis. Penelitian ini difokuskan untuk mempelajari kaitan antara kematian mencit dengan profil hematologi khususnya PCV, anemia dan virulensi *T. evansi* dari beberapa isolat Indonesia. Penelitian dilakukan dengan membagi mencit kedalam 4 grup. Tiga grup diinfeksi *T. evansi* sesuai isolat yang digunakan dan satu grup kelompok normal. Pengamatan dilakukan setiap dua hari sekali dengan mengamati kematian mencit, parasitemia, nilai PCV dan jumlah eritrosit. Hasil penelitian menunjukkan bahwa derajat parasitemia tidak selalu memiliki kaitan dengan kematian dan anemia. Penurunan nilai PCV memiliki kaitan dengan parasitemia tetapi tidak selalu berkaitan dengan anemia. Penelitian ini juga menunjukkan tidak adanya kaitan antara penurunan nilai PCV maupun anemia dengan kematian mencit karena trypanosomiasis.

Kata kunci: *Trypanosoma evansi*, nilai PCV, anemia, mortalitas, virulensi

PENDAHULUAN

Trypanosomiasis (Surra) merupakan salah satu penyakit yang endemik di Indonesia. Surra disebabkan oleh protozoa *Trypanosoma evansi* dan menyerang berbagai jenis hewan, terutama kuda, sapi dan kerbau. Kasus terbaru di Indonesia terjadi di Pulau Sumba Propinsi Nusa Tenggara Timur pada tahun 2010 – 2011 yang mengakibatkan kematian pada 1159 ekor kuda, 600 ekor kerbau dan seekor sapi (Anonimus, 2012). Kematian pada trypanosomiasis umumnya akibat anemia yang berat (Onah *et al.*, 1996). Adapun Verdillo *et al.*, (2012) menyatakan bahwa kematian cepat pada mencit yang diinfeksi *T. evansi* dapat disebabkan beberapa

kemungkinan yaitu cepatnya reproduksi *Trypanosoma* dalam darah atau destruksi glukosa di hati yang menyebabkan disfungsi hati. Kemungkinan lainnya adalah pelepasan sitokin proinflamatorik secara berlebihan sehingga toksik bagi inang atau pelepasan protease (baik lisosomal, fosofolipase atau hidrolitik enzim lainnya) yang akan mendegradasi jaringan inang. Nilai PCV (*Packed cell volume*) cenderung menurun pada semua mencit yang diinfeksi dan anemia progresif merupakan gejala klinis utama pada trypanosomiasis (Verdillo *et al.*, 2012). Namun Carmona *et al.* (2006) melaporkan hasil yang berbeda. Pada setiap kasus trypanosomiasis di mencit, kematian terjadi pada

*Diterima: 30 Desember 2012 - Disetujui: 18 Februari 2013

periode waktu yang relatif pendek dan mencit yang menampakkan parasitemia tinggi, tidak berlanjut dengan anemia maupun gejala klinis. Antoine-Moussiaux *et al.* (2008) menyatakan bahwa semua *African trypanosomiasis* menyebabkan gejala patologi yang umum seperti immunosupresi, kaheksia dan anemia yang mana mekanismenya dapat beragam. Daya hidup (*survival*) merupakan parameter atau variabel yang tidak presisi karena penyebab kematian sangat bervariasi diantaranya galur mencit, spesies trypanosoma, status penyakit dan *systemic inflammatory response syndrome* (SIRS), gagal ginjal, anemia, invasi saraf pusat dan imunodepresi yang disertai infeksi sekunder.

Anemia (jumlah eritrosit dibawah nilai normal) umumnya bersifat menahun (kronis) sedangkan pada kondisi akut atau sub akut sangat jarang dijumpai. Pada mencit, infeksi *T. evansi* dapat mengakibatkan kematian sangat cepat (≤ 6 hari pasca infeksi) atau bahkan lebih lama (10 – 24 hari pasca infeksi) sebagaimana dilaporkan Subekti *et al.*, (2013). Oleh karena itu perlu dipelajari dan dibuktikan kaitan antara penurunan PCV, anemia, dan perbedaan virulensi *T. evansi* dengan kematian pada mencit. Hal demikian dipandang perlu karena umumnya menghubungkan trypanosomiasis dengan penurunan PCV, anemia dan kematian tidak mempertimbangkan jenis hewan yang diserang, perbedaan virulensi *T. evansi* maupun pola pengamatan dalam penelitian tersebut. Pada penelitian ini difokuskan untuk membuktikan keterkaitan antara kematian hewan coba mencit dengan perubahan hematologi khususnya penurunan PCV dan anemia serta virulensi *T. evansi* yang berbeda dari isolat Indonesia.

BAHAN DAN METODA

Propagasi Isolat *T. evansi*

Isolat *T. evansi* yang digunakan dalam penelitian berasal dari isolat Bangkalan (Madura – Jawa Timur), isolat Pidie (Nangroe Aceh Darussalam) dan isolat Pemalang (Jawa Tengah). Semua isolat *T. evansi* (3 isolat) diremajakan dan

diperbanyak dengan disuntikkan pada mencit galur DDY secara intraperitoneal (*i.p.*). Mencit diamati setiap hari dengan cara memotong sebagian kecil vena pada ujung ekor dan diamati secara natif adanya parasitemia. Apabila parasitemia telah mencapai $10^7 - 10^8$ trypanosoma/mL darah, maka isolat *T. evansi* tersebut siap untuk digunakan dalam penelitian.

Infeksi *T. evansi* dan Pengamatan Daya Hidup

T. evansi yang telah siap digunakan diambil dari darah perifer (vena pada ujung ekor atau jantung) dengan menggunakan antikoagulan heparin dan PBSG (PBS-Glukosa). Sebanyak 1 – 10 mL darah yang mengandung *T. evansi* diencerkan 100 – 1000 x (tergantung tingkat parasitemianya) dengan PBSG. Pada saat akan diencerkan, darah yang mengandung *T. evansi* di tambahkan dengan SDS (*sodium dodecyl sulphate*) 1 % terlebih dahulu sebelum ditambahkan PBSG. Pengenceran dilakukan untuk mendapatkan dosis 10^4 trypanosoma /ekor mencit dan disuntikkan secara *i.p.* Digunakan 20 ekor mencit, dibagi ke dalam 4 kelompok (5 ekor per kelompok) sesuai dengan isolat yang akan diuji yaitu kelompok Bangkalan, Pemalang, Pidie dan Kontrol. Mencit tersebut setelah diinfeksi, diamati daya hidupnya setiap hari dan diperiksa parasitemianya, jumlah eritrosit dan PCV setiap dua hari sekali.

Penghitungan Parasitemia dalam pembuluh darah perifer.

Penghitungan parasitemia dalam darah perifer dilakukan setiap 2 hari sekali. Ujung ekor dipotong dan darah ditampung (± 10 mL) dan di campur dengan SDS 1 % (1:1). Segera setelah dicampur homogen, darah diencerkan dalam PBSG dengan perbandingan (1:100 atau 1:1000) sesuai derajat parasitemia. Campuran darah – SDS 1 % dan PBSG dihomogenisasi dan kemudian diperiksa dengan menggunakan *haemocytometer* (*Neubauer Improved*). Jumlah dihitung dalam kamar hitung leukosit dan ditetapkan jumlah parasitnya dengan menggunakan rumus berikut :

$$\text{Jumlah parasit/mL} = A \times B \times 10^4$$

A = Jumlah Trypanosoma yang terhitung di Ruang Leukosit

B = Pengenceran suspensi saat akan dilakukan penghitungan

Pengukuran PCV dan Penghitungan Jumlah Eritrosit.

Setiap dua hari sekali dilakukan pula penghitungan hematokrit atau PCV (*Packed Cell Volume*) dan jumlah eritrosit (sel darah merah). Ujung ekor dipotong dan darah dihisap kedalam kapiler mikrohematokrit (*heparinized*) sampai terisi lebih dari 3/4 volume kapiler mikrohematokrit (Assistent). Tabung mikrohematokrit kemudian ditutup dengan *critoseal* (Marienfeld, Germany) pada salah satu ujungnya dan disentrifus pada kecepatan 13.000 rpm selama 5 – 10 menit. Apabila darah dan plasma telah terpisah dalam mikrohematokrit, nilai PCV dibaca dengan menggunakan *Microhaematocrit Reader* (Hawksley) dan dinyatakan dalam satuan persen (%).

Pada penghitungan jumlah eritrosit, 1 mL darah dari vena ekor dilarutkan kedalam 200 mL larutan *Dacie's Formol-Citrate* (3 g sodium sitrat, 1 mL formaldehida 40% dalam 100 mL H₂O).

Larutan tersebut dihomogenkan, darah diperiksa menggunakan *haemocytometer* (*Neubauer Improved*). Jumlah dihitung dalam kamar hitung eritrosit dan ditetapkan jumlahnya menggunakan rumus berikut :

$$\text{Jumlah eritrosit/mm}^3 = N \times 10^4$$

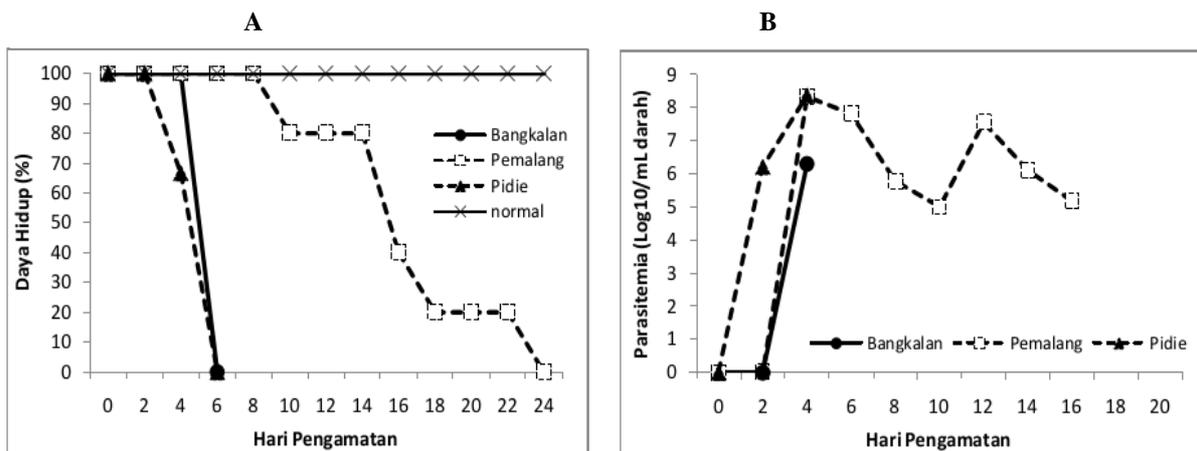
N = jumlah eritrosit yang dihitung pada Ruang Eritrosit

HASIL

Daya Hidup dan Parasitemia.

Daya hidup (*survivality*) dan profil parasitemia masing masing kelompok mencit yang diinfeksi *T. evansi* dari isolat yang berbeda, ditampilkan pada Gambar 1. Pada Gambar 1A., dapat diketahui bahwa isolat dari Bangkalan dan Pidie menyebabkan 100 % kematian yang sangat cepat yaitu 6 hari pasca infeksi (hpi). Adapun isolat dari Pemalang menyebabkan 100 % kematian pada 24 hpi. Pada isolat Pemalang, 80 % mencit masih mampu bertahan hidup sampai 14 hpi.

Periode prepaten (periode dimana *T. evansi* pertama kali teramati dalam darah tepi) untuk isolat Bangkalan adalah 4 hpi (Gambar 1B) dan kemudian diikuti dengan 100 % kematian pada 6 hpi (Gambar



Gambar 1. Daya hidup (*survivality*) dan profil parasitemia masing masing kelompok mencit yang diinfeksi *T. evansi* dari isolat yang berbeda.

(A). Rata-rata daya hidup mencit masing-masing kelompok (dalam satuan “%”)

(B). Rata-rata parasitemia dalam darah mencit masing-masing kelompok (dalam satuan Log10/mL darah)

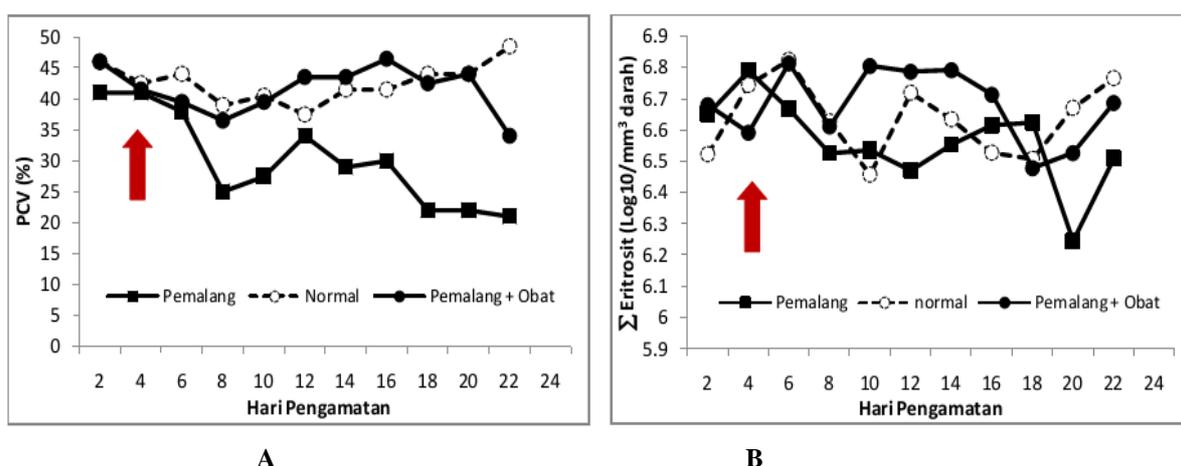
1A). Sebaliknya, isolat Pidie memiliki periode prepaten pada 2 hpi (Gambar 1B) dan diikuti dengan 100 % kematian pada 6 hpi (Gambar 1A). Sebaliknya, isolat Pemalang memiliki peripode prepaten pada 4 hpi (Gambar 1B) dengan 100 % kematian pada 24 hpi. Isolat dari Pemalang juga memiliki ciri berupa parasitemia undulan (*undulance parasitaemia*) yang merupakan salah satu ciri *African trypanosomiasis*.

Profil PCV dan Jumlah Eritrosit pada Mencit diinfeksi *T. evansi*.

Hasil pengamatan PCV dan jumlah eritrosit mencit yang diinfeksi *T. evansi* ditampilkan pada Gambar 2. PCV (*Packed Cell Volume*) pada mencit yang diinfeksi dengan *T. evansi* isolat Bangkalan tidak mengalami perubahan. Mencit DDY yang digunakan pada penelitian ini, secara normal memiliki nilai PCV berkisar antara 24 % - 51 %. Pada kelompok mencit yang diinfeksi dengan isolat Bangkalan, memiliki nilai tengah PCV yaitu 39,5 % (pada 0 hpi). Selanjutnya setelah diinfeksi berubah menjadi 40,17 % (pada 2 hpi) dan 39 % (pada 4 hpi). Adapun nilai tengah PCV pada kelompok mencit yang diinfeksi dengan isolat Pidie sedikit menurun tetapi masih dalam kategori normal. Pada keadaan awal, nilai tengah PCV-nya adalah 44,5 %, kemudian menjadi 41,67 % (pada 2 hpi) dan 39 %

(pada 4 hpi). Sebaliknya pada mencit yang diinfeksi dengan isolat Pemalang menunjukkan profil PCV yang dinamik (Gambar 2A). Sejak hari ke-18 nilai PCV maupun jumlah eritrosit (Gambar 2) hanya berasal dari 1 ekor mencit karena yang lainnya telah mati.

Setiap mencit memiliki rentang normal jumlah eritrosit yang berbeda tergantung galurnya, kondisi fisiologis ataupun jenis kelaminnya. Pada mencit DDY yang digunakan pada penelitian ini, rentang normal jumlah eritrositnya berkisar antara $2,04 \times 10^6 \text{ sel/mm}^3 - 7,28 \times 10^6 \text{ sel/mm}^3$. Rentang normal eritrosit dalam darah mencit dapat mengalami perubahan apabila diinfeksi dengan *T. evansi*. Pada kelompok mencit yang diinfeksi dengan isolat Bangkalan, memiliki nilai tengah eritrosit yaitu $5,51 \times 10^6 \text{ sel/mm}^3$ (pada 2 hpi) dan $3,38 \times 10^6 \text{ sel/mm}^3$ (pada 4 hpi). Adapun nilai tengah eritrosit pada kelompok mencit yang diinfeksi dengan isolat Pidie adalah $4,36 \times 10^6 \text{ sel/mm}^3$ (pada 2 hpi) dan $4,68 \times 10^6 \text{ sel/mm}^3$ (pada 4 hpi). Semua nilai tengah eritrosit dari kelompok mencit yang diinfeksi dengan isolat Bangkalan maupun Pidie berada dalam kategori normal. Sebaliknya pada mencit yang diinfeksi dengan isolat Pemalang menunjukkan profil jumlah eritrosit yang dinamik (Gambar 2B), bahkan



Gambar 2. Profil PCV dan jumlah eritrosit pada masing-masing kelompok mencit yang diinfeksi *T. evansi* isolat Pemalang. Tanda panah merah menunjukkan waktu dilakukan pengobatan pada sebagian mencit dari kelompok yang diinfeksi. (A) Rata-rata nilai PCV (%) dan (B) Rata-rata jumlah eritrosit (Log10/mm³ darah)

satu ekor yang tersisa mengalami anemia pada hari ke-20 namun pada hari ke-22 kembali normal.

Perbandingan Patobiologi Tiga Isolat *T. evansi* pada Mencit.

Apabila diperhatikan pada Tabel 1, maka terlihat bahwa mencit yang diinfeksi oleh *T. evansi* isolat Bangkalan dan Pidie memiliki pola yang serupa. Mencit yang mati dalam waktu singkat setelah infeksi *T. evansi* isolat Bangkalan dan Pidie ternyata tidak diikuti dengan anemia dan penurunan PCV. Namun sebaliknya pada mencit yang diinfeksi isolat Pemalang, kematian mencit pada umumnya tidak disertai dengan anemia. Adapun kasus anemia yang terjadi pada mencit yang diinfeksi isolat Pemalang bersifat temporer karena segera pulih sebelum mati. Secara umum, penurunan PCV dibawah normal juga tidak memiliki keterkaitan yang konsisten dengan kematian kecuali secara individual.

Profil PCV, Anemia dan Parasitemia Individu Mencit yang diinfeksi Isolat Pemalang

Pada Gambar 3.A1 sampai 3.A5 terlihat bahwa secara individual pola parasitemia mencit yang diinfeksi isolat Pemalang memiliki kesamaan yang ditandai dengan penurunan parasit dari darah kemudian meningkat kembali. Pola demikian disebut parasitemia undulan, yaitu menurun secara tajam kemudian diikuti dengan kenaikan tajam kembali (Subekti *et al.*, 2013). Pola demikian nampaknya sejalan dengan pola PCV secara individual pada mencit yang diinfeksi isolat Pemalang (Gambar 3.B1 sampai 3.B4) kecuali mencit kelima yang bertahan hidup paling lama (Gambar 3.B5). Adapun profil eritrosit hanya bersesuaian dengan pola parasitemia hanya pada mencit ketiga (Gambar 3.C3), sedangkan mencit lainnya menunjukkan kecenderungan pola yang menurun (Gambar 3.C1 sampai 3.C5).

PEMBAHASAN

Kematian dan Parasitemia pada Mencit.

Kematian mencit setelah diinfeksi *T. evansi* isolat Bangkalan maupun Pidie terjadi sangat cepat (Gambar 1). Kematian 100% tersebut terjadi hampir serentak tanpa banyak mempengaruhi PCV maupun

jumlah eritrosit pada mencit. Hal tersebut bertolak belakang dengan mencit yang diinfeksi *T. evansi* isolat Pemalang. Kematian paling awal pada mencit yang diinfeksi isolat Pemalang terjadi 10 hpi dan paling akhir pada 24 hpi. Hal ini menunjukkan perbedaan virulensi dari isolat *T. evansi* yang digunakan. Isolat Bangkalan dan Pidie memiliki virulensi yang tinggi pada mencit DDY dan membunuh semua hewan coba dalam waktu ≤ 6 hari. Rata-rata hidup mencit yang diinfeksi isolat Bangkalan adalah 4,5 hari sedangkan yang diinfeksi isolat Pidie 3,5 hari. Adapun isolat Pemalang memiliki virulensi yang lebih rendah dengan kemampuan membunuh semua hewan coba terjadi pada 24 hari. Rata-rata hidup mencit yang diinfeksi dengan isolat Pemalang adalah 15,2 hari. Rata-rata hidup mencit yang diinfeksi isolat Bangkalan pada penelitian ini lebih lama dibanding penelitian sebelumnya yang dilaporkan Subekti *et al.* (2013) yaitu 4,4 hari. Adapun rata-rata lama hidup mencit yang diinfeksi isolat Pemalang pada penelitian ini lebih cepat dibanding penelitian sebelumnya yaitu 17,2 hari (Subekti *et al.*, 2013).

Beberapa laporan menyebutkan bahwa perbedaan galur mencit akan mempengaruhi pola parasitemia dan daya hidup yang berbeda pula (De-Menezes *et al.*, 2004 dan Carmona *et al.*, 2006). Perbedaan daya hidup galur mencit hanya perbedaan kecepatan kematiannya, mencit yang peka akan lebih cepat mengalami kematian dibanding mencit yang kurang peka (Carmona *et al.*, 2006 dan Antoine-Moussiaux *et al.*, 2008). Namun demikian, pada dasarnya infeksi *T. evansi* selalu menyebabkan kematian 100 % pada semua galur mencit (De-Menezes *et al.*, 2004). Hal ini disebabkan karena mencit merupakan hewan model yang peka terhadap infeksi *T. evansi*. Mencit yang berbeda juga memiliki kemampuan merespon parasitemia yang berbeda sehingga menimbulkan pola parasitemia yang berbeda sebagaimana dilaporkan De-Menezes *et al.* (2004). Disisi lain, galur trypanosoma yang berbeda juga dapat menimbulkan pola parasitemia, pola kematian mencit dan profil hematologi yang berbeda

Tabel 1. Ringkasan Patobiologi dari kelompok mencit yang diinfeksi *T.evansi* dari isolat yang berbeda

Isolat	Periode Prepaten (hpi) ± SE	Lama Hidup (hpi) ± SE	Lama hidup Pasca Periode prepaten (hpi)*	2 hpi	4 hpi	6 hpi	8 hpi	10 hpi	12 hpi	14 hpi	16 hpi	≥ 18 hpi
Bangkalan, Jawa Timur	4	4,5 ± 0,224	0,5	Distribusi persentase kematian								
				0 %	0 %	100 %	-	-	-	-	-	-
				Distribusi hewan yang memiliki nilai PCV normal								
				100 %	100 %	-	-	-	-	-	-	--
				Distribusi hewan yang anemia								
0 %	0 %	-	-	-	-	-	-	-	-			
Pidie, Nagroe Aceh Darussalam	2	3,5 ± 0,224	1,5	Distribusi persentase kematian								
				0 %	50 %	50 %	-	-	-	-	-	-
				Distribusi hewan yang memiliki nilai PCV normal								
				100 %	100 %	-	-	-	-	-	-	-
				Distribusi hewan yang anemia								
0 %	0 %	-	-	-	-	-	-	-	-			
Pemalang, Jawa Tengah	4,8 ± 0,489	15,2 ± 2,245	10,4	Distribusi persentase kematian								
				0 %	0 %	0 %	0 %	20 %	-	-	40 %	40 %
				Distribusi hewan yang memiliki nilai PCV normal								
				100 %	100 %	100 %	60 %	75 %	100 %	75 %	100 %	0 %**
				Distribusi hewan yang anemia								
0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	50 %	25 %	0 %	***				

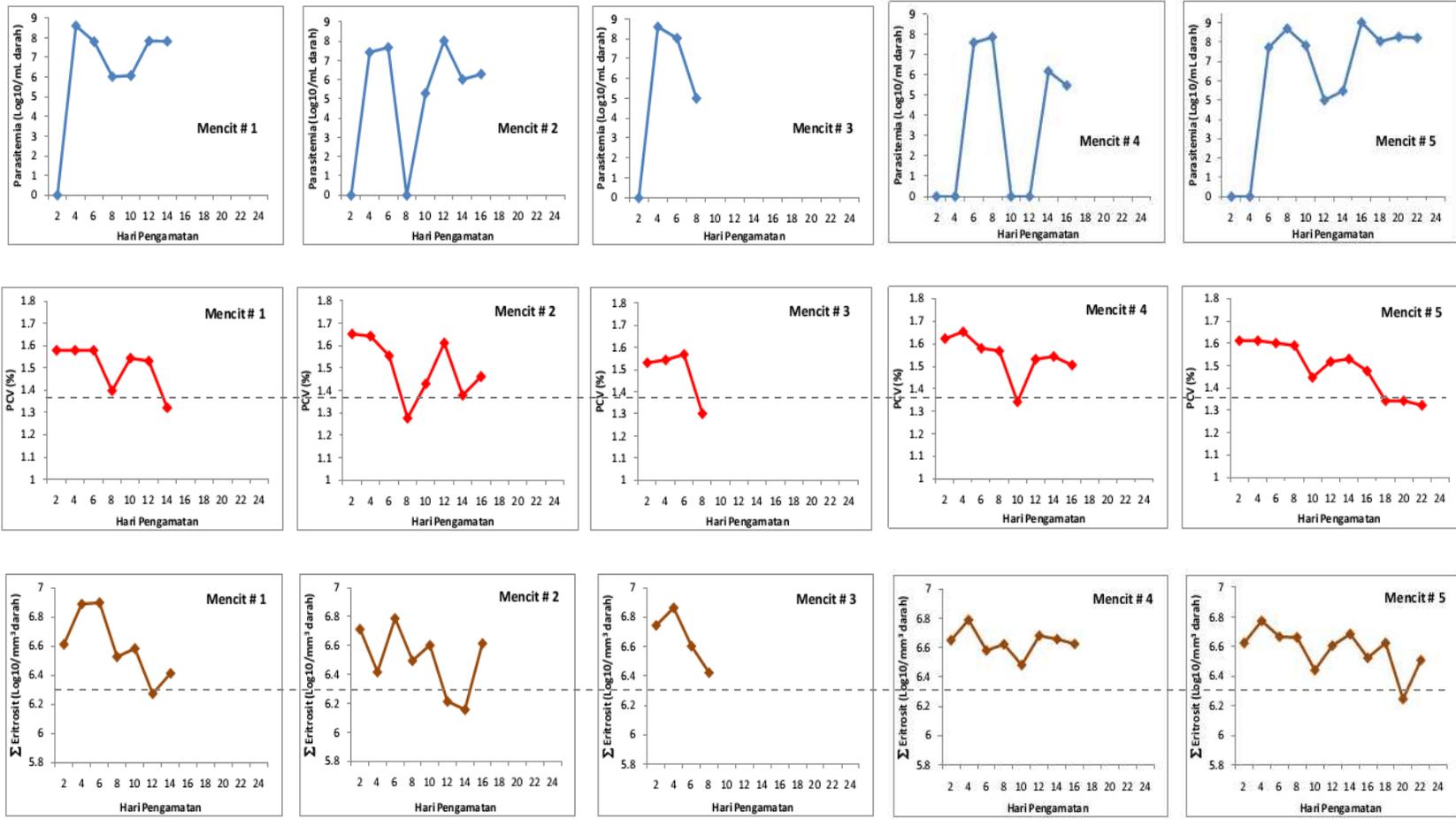
Keterangan :

* dihitung berdasarkan : “(rata-rata lama hidup) – (rata-rata periode prepaten)”

** mencit hanya tersisa 1 ekor dan PCV-nya rendah sejak 18 hpi sampai mengalami kematian pada 24 hpi.

*** mencit tersisa 1 ekor dan sejak awal (0 hpi) percobaan, anemia hanya terjadi pada 20 hpi kemudian kembali normal pada 22 hpi dan mati pada 24 hpi.

Tanda “-” bermakna tidak ada kematian yang teramati.



Gambar 3. Pola parasitemia (A1-A5), profil PCV (B1-B5) dan profil jumlah eritrosit (C1-C5) pada masing masing mencit DDY yang diinfeksi *T.evansi* isolat Pemalang. Parasitemia dalam darah dinyatakan dalam satuan “Log₁₀/mL darah”, nilai PCV ditransformasi dengan Log₁₀ dan dinyatakan dalam satuan “%” dan jumlah eritrosit dinyatakan dalam satuan “Log₁₀/mm³ darah”. Garis putus-putus menunjukkan nilai fisiologi normal yang terendah, jika nilai dibawah garis putus-putus dinyatakan anemia / abnormal.

pula (Subekti *et al.*, 2013). Dengan demikian pada penelitian De-Menezes *et al.* (2004) mengisyaratkan adanya variasi respon biologi inang (mencit), sedangkan penelitian Subekti *et al.* (2013) mengisyaratkan adanya keragaman atau perbedaan virulensi parasit (*T.evansi*).

Virulensi merupakan derajat patogenitas dari suatu mikroorganisme yang diindikasikan dengan rata-rata kefatalan kasus (*case fatality rate, CFR*) atau kemampuannya menginvasi jaringan inang (Verdillo *et al.*, 2012). CFR ditetapkan berdasarkan proporsi kematian dari populasi atau sekelompok hewan yang memiliki kasus penyakit yang sama. Adapun invasi jaringan berkaitan dengan kerusakan jaringan dan patofisiologi inang terkait infeksi oleh mikroorganisme. Pada percobaan ini CFR dari *T.evansi* isolat Bangkalan dan Pidie adalah 100 % dalam kurun waktu ≤ 6 hpi, sebaliknya CFR pada isolat Pemalang adalah 100 % yang dicapai pada 24 hpi (Tabel 2). Hal ini karena mencit merupakan hewan yang peka dan tidak ada yang resisten terhadap *T. brucei*, *T. congolense*, *T. evansi* serta *T. vivax*, namun hanya waktu hidupnya yang berbeda (Antoine-Moussiaux *et al.*, 2008).

Isolat Bangkalan dan Pidie memiliki perbedaan dalam periode prepaten. Periode prepaten adalah waktu pertamakali terdeteksi atau teramatinya *T. evansi* dalam darah perifer sejak pertama kali diinfeksi ke tubuh hewan. Periode prepaten dari isolat Bangkalan adalah 4 hpi sedangkan isolat Pidie yaitu 2 hpi. Kematian pada kelompok mencit yang diinfeksi dengan isolat Bangkalan mulai terjadi pada 5 dan 6 hpi sehingga rata-rata lama hidupnya 4,5 hpi (Tabel 2). Dengan demikian jarak waktu terjadinya kematian sejak parasitemia pertama kali terdeteksi adalah 1 – 2 hari. Sebaliknya pada kelompok mencit yang diinfeksi dengan isolat Pidie, kematian mulai terjadi pada 4 dan 5 hpi. Hal tersebut menunjukkan bahwa jarak waktu kematian sejak parasitemia pertama kali terdeteksi adalah 2 – 3 hari. Ditinjau dari jarak waktu kematian sejak periode prepaten, isolat Bangkalan cenderung lebih ganas dibanding isolat Pidie. Begitu pula jika dilihat dari rata-rata

lama hidup pasca periode prepaten (Tabel 2).

Pola parasitemia dan kematian yang terjadi pada kelompok mencit yang diinfeksi *T. evansi* isolat Bangkalan dan Pidie cenderung konsisten pada tiga percobaan yang berbeda (data belum dipublikasi). Pola parasitemia dan kematian pada mencit yang diakibatkan oleh kedua isolat tersebut merupakan ciri *T. evansi* biotipe 1 (Subekti *et al.*, 2013). Walaupun demikian, nilai tengah parasitemia dari isolat Bangkalan ($2,03 \times 10^6$ parasit/mL darah) lebih rendah dibanding isolat Pidie ($2,35 \times 10^8$ parasit/mL darah). Secara rinci, 50 % mencit yang diinfeksi isolat Bangkalan mengalami kematian pada 5 hpi setelah parasitemia mencapai $7 \times 10^5 - 2,8 \times 10^6$ parasit/mL darah, dan 50% lainnya mengalami kematian (6 hpi) setelah parasitemia mencapai $1,41 \times 10^8 - 5,8 \times 10^8$ parasit/mL darah. Adapun pada kelompok yang diinfeksi dengan isolat Pidie, 50% mencit mengalami kematian pada 4 hpi setelah parasitemia mencapai $1,8 \times 10^8 - 4,8 \times 10^9$ parasit/mL darah, dan 50 % lainnya mengalami kematian (5 hpi) setelah parasitemia mencapai $1,69 \times 10^8 - 6 \times 10^8$ parasit/mL darah. Berdasarkan beban parasitemia (jumlah parasit dalam darah) dan juga jarak waktu kematian sejak periode prepaten, maka isolat Bangkalan cenderung lebih ganas dibandingkan isolat dari Pidie.

Disisi lain, isolat Pemalang memiliki karakter unik berupa profil parasitemia dengan kurva bergelombang yang dikenal dengan parasitemia undulan. Pola parasitemia undulan menunjukkan adanya regulasi biologis didalam tubuh hewan sehingga kepadatan parasit dalam darah akan menurun tajam dan kembali meningkat tajam pada waktu tertentu. Umumnya, penurunan yang tajam akan terjadi apabila parasitemia mengalami reduksi ≥ 100 kali lipat dari status parasitemia sebelumnya. Pada kelompok mencit yang diinfeksi isolat Pemalang, puncak parasitemia umumnya berkisar 10^8 parasit/mL darah dan akan menurun sampai 10^5 parasit/mL darah. Setelah menurun, akan kembali meningkat pada $10^7 - 10^8$ parasit/mL darah. Penurunan yang tajam umumnya terjadi pada kisaran

8 – 10 hpi. Pola demikian serupa dengan yang dilaporkan Subekti *et al.* (2013) pada penelitian sebelumnya. Pada percobaan ini diketahui bahwa 1 ekor mencit (mencit nomor 2, Gambar 3A) justru mengalami dua kali parasitemia undulan yaitu pada 8 hpi dan 14 hpi. Pada 8 hpi terjadi penurunan parasitemia dari $4,8 \times 10^7$ parasit/mL darah menjadi 0 parasit/mL darah (tidak terdeteksi dari darah perifer). Adapun pada 14 hpi terjadi penurunan parasitemia dari $1,07 \times 10^8$ menjadi $1,05 \times 10^6$ parasit/mL darah. Pola dengan kematian paling cepat ≥ 10 hpi disertai parasitemia undulan merupakan ciri dari isolat *T. evansi* biotipe 2 sebagaimana dijelaskan subekti *et al.* (2013).

Secara umum dapat dijelaskan bahwa kecepatan waktu kematian mencit yang diinfeksi oleh *T. evansi* memiliki kaitan dengan virulensi masing-masing isolat. Adapun derajat parasitemia tidak secara langsung berkaitan dengan mortalitas mencit. Hasil penelitian ini menolak kemungkinan pertama dari pernyataan Verdillo *et al.* (2012) yang menyatakan bahwa kematian yang cepat pada mencit yang diinfeksi *T. evansi* dapat disebabkan beberapa kemungkinan diantaranya adalah reproduksi trypanosoma yang cepat dapat berbahaya karena eksploitasi inang secara berlebihan yang mengakibatkan kerusakan yang parah. Derajat parasitemia yang berkaitan dengan kematian mencit DDY sesungguhnya ditentukan oleh virulensi *T. evansi* yang diinfeksi.

Perubahan Nilai PCV dan Jumlah Eritrosit pada Mencit diinfeksi *T. evansi*.

PCV dipengaruhi dua faktor utama, yaitu jumlah eritrosit dalam darah (komponen seluler) dan volume plasma darah (komponen cairan). Leukosit, walaupun merupakan komponen seluler dalam darah, namun jumlahnya lebih kecil dibanding eritrosit. Oleh sebab itu keberadaan leukosit dalam mempengaruhi nilai PCV jauh lebih kecil dibanding eritrosit. Nilai normal PCV mencit pada percobaan ini adalah 24 – 51 % yang didasarkan pada pengukuran semua mencit sebelum digunakan

bersama kelompok normal.

Kelompok mencit yang diinfeksi *T. evansi* isolat Bangkalan dan Pidie tidak mengalami perubahan status PCV dari kategori normal. Namun pada kelompok mencit yang diinfeksi isolat Pidie terdapat kecenderungan mengalami penurunan nilai PCV meskipun masih dalam kategori normal. Demikian pula halnya dengan kelompok mencit yang diinfeksi dengan isolat Pematang, nilai PCVnya juga berfluktuasi dengan kecenderungan mengalami penurunan dibandingkan kelompok normal. Pada kelompok mencit yang diinfeksi isolat Pematang, sejak 8 hpi sudah mulai terlihat adanya nilai PCV yang rendah (abnormal) dan berfluktuasi antara normal dan abnormal (PCV rendah). Walaupun demikian, pada mencit yang diinfeksi isolat Pematang, penurunan nilai PCV yang tajam secara konsisten mulai terjadi pada 4 hari setelah periode prepaten (8 – 10 hpi).

Berdasarkan data tersebut (Gambar 1, 2 dan 3 serta Tabel 2), diperkirakan bahwa beban parasitemia yang tinggi dan jangka waktu parasitemia yang panjang akan mempengaruhi penurunan nilai PCV dalam darah mencit. Apabila beban parasitemia tinggi dalam darah dan parasit berada dalam darah pada waktu cukup lama, kemungkinan nilai PCV akan menunjukkan profil menurun dan kadangkala dibawah normal sebagaimana terjadi pada kelompok mencit yang diinfeksi isolat Pematang. Adapun pada isolat Bangkalan, sebelum parasitemia mencapai puncak, mencit lebih dahulu mati dan PCV belum mengalami penurunan.

Pembuktian keterkaitan antara infeksi *T. evansi* isolat pematang dengan nilai PCV mencit juga diketahui dari mencit yang diinfeksi isolat Pematang dan diobati. Pada mencit yang diinfeksi isolat Pematang dan diobati dengan *Melarsomine dehydrochloride* pada saat beban parasitemia mencapai 10^8 parasit/mL darah (pada 4 hpi) menunjukkan profil yang serupa dengan mencit normal (Gambar 2A). Mencit yang diinfeksi isolat pematang dan diobati memiliki nilai PCV yang dikategorikan normal sampai 24 hari pengamatan.

Demikian pula halnya mencit yang diinfeksi isolat Pidie dan diobati (data tidak ditampilkan). Bukti tersebut memperkuat konsistensi data yang menunjukkan kemungkinan adanya keterkaitan antara infeksi *T. evansi* dengan kecenderungan penurunan PCV (Gambar 3). Namun demikian, rendahnya nilai PCV dibawah normal tidak senantiasa terjadi pada pola yang konsisten dan hanya terjadi sesekali pada parasitemia jangka panjang (Tabel 1).

Penyebab utama dan mekanisme menurunnya PCV atau bahkan sampai dibawah nilai normal pada infeksi *T. evansi* belum sepenuhnya diketahui secara pasti. Beberapa peneliti berpendapat bahwa penurunan jumlah eritrosit maupun anemia akan menyebabkan terjadinya penurunan PCV (Onah *et al.*, 1996, Herrera *et al.*, 2004, Verdillo *et al.*, 2012). Trypanosomiasis dilaporkan menyebabkan anemia pada berbagai macam hewan percobaan baik ruminansia besar dan kecil, kuda, kerbau, kelinci dan rodensia (Okochi *et al.*, 2003, Herrera *et al.*, 2004, Antoine-Moussiaux *et al.*, 2008, Takeet dan Fagbemi, 2009, Habila *et al.*, 2012 dan Mbaya *et al.*, 2012). Anemia tersebut diduga terjadi dengan beragam mekanisme. Sebaliknya, belum diketahui adanya kelompok peneliti yang menyatakan bahwa infeksi *T. evansi* berkaitan dengan meningkatnya volume plasma darah. Peningkatan volume plasma darah karena suatu sebab juga dapat mengakibatkan menurunnya nilai PCV meskipun jumlah eritrositnya normal.

Hasil penghitungan jumlah eritrosit secara periodik menampakkan pola yang acak secara individual (Gambar 3). Pada kelompok mencit yang diinfeksi dengan isolat Bangkalan maupun Pidie tidak menunjukkan adanya anemia. Pada mencit yang diinfeksi isolat Bangkalan, jumlah eritrositnya mengalami penurunan yang ringan dari $4,37 \times 10^6$ – $6,72 \times 10^6$ sel/mL darah menjadi $2,75 \times 10^6$ – $3,61 \times 10^6$ sel/mL darah. Sebaliknya pada mencit yang diinfeksi isolat Pidie justru mengalami peningkatan jumlah eritrosit, yaitu $2,18 \times 10^6$ – $5,22 \times 10^6$ sel/mL darah menjadi $3,9 \times 10^6$ – $6,64 \times 10^6$ sel/mL darah

(pada 5 dari 6 ekor mencit). Adapun satu ekor lainnya mengalami penurunan jumlah eritrosit dari $4,23 \times 10^6$ sel/mL darah menjadi $2,84 \times 10^6$ sel/mL darah. Dengan demikian, hasil ini bertolak belakang dengan data perubahan PCV pada kelompok mencit yang diinfeksi isolat Bangkalan maupun Pidie.

Pada kelompok mencit yang diinfeksi isolat Pemalang juga tidak menunjukkan adanya anemia secara kontinyu (Tabel 1), bahkan secara umum profil jumlah eritrositnya tidak berbeda dengan mencit normal (Gambar 2B). Secara individual, profil PCV (Gambar 3B) umumnya terjadi secara konsisten yaitu menurun pada 6 – 8 dpi. Adapun dinamika jumlah eritrosit pada masing-masing mencit memiliki pola yang berbeda-beda (Gambar 3C). Profil PCV cenderung sejalan dengan profil parasitemia sedangkan profil eritrosit cenderung menurun (Gambar 3). Pola tersebut menunjukkan bahwa PCV dan jumlah eritrosit tidak berjalan secara beriringan (Tabel 1 dan Gambar 3). Apabila dilakukan perbandingan dengan pola parasitemia, maka pola dinamika jumlah eritrosit juga tidak selalu sejalan (Gambar 3).

Penurunan PCV tidak serta merta disertai penurunan jumlah eritrosit. Pada mencit kesatu dan kelima, nilai PCV menurun pada 12 – 14 dpi tetapi jumlah eritrositnya meningkat. Demikian pula halnya dengan mencit kedua dan keempat pada 4 – 6 dpi dan 6 – 8 dpi. Sebaliknya pada mencit ketiga, nilai PCVnya meningkat pada 4 – 6 dpi sementara jumlah eritrositnya mengalami penurunan. Secara keseluruhan, fakta ini menunjukkan bahwa penurunan dan peningkatan PCV tidak berjalan searah dengan penurunan dan peningkatan jumlah eritrosit dalam darah (Gambar 3B dan 3C).

Ditinjau dari sisi fisiologi, rendahnya PCV juga tidak selalu sejalan dengan anemia. Pada kelompok yang diinfeksi isolat Pemalang, PCV mencit kesatu dikategorikan rendah dibawah nilai rentang normal pada 14 dpi, sedangkan jumlah eritrositnya dikategorikan normal (Gambar 3). Demikian pula pada mencit kedua dan ketiga pada 8 dpi, kemudian mencit keempat pada 10 dpi. Pada

mencit kedua, anemia terjadi pada 12 dan 14 dpi, namun PCV pada hari itu dikategorikan normal. Kesesuaian hanya ditemukan pada mencit kelima dimana PCV dinyatakan rendah pada 18 – 22 dpi, sedangkan anemia terjadi hanya pada 20 dpi. Hasil ini mengindikasikan bahwa rendahnya nilai PCV tidak selalu disertai dengan anemia. Hal tersebut dapat dipahami karena rendahnya PCV yang terukur dapat disebabkan oleh meningkatnya volume plasma darah meskipun jumlah eritrosit masih dalam kategori normal.

Berdasarkan pembahasan diatas dapat disimpulkan bahwa penurunan PCV dan penurunan jumlah eritrosit tidak selalu bersesuaian atau sejalan. Rendahnya nilai PCV juga tidak selalu disebabkan oleh anemia. Oleh karena itu, menetapkan anemia berdasarkan nilai PCV sebagaimana dilakukan oleh Verdillo *et al.*(2012) merupakan kekeliruan yang tidak dapat diterima. Demikian pula pernyataan bahwa penurunan atau rendahnya PCV disebabkan penurunan jumlah eritrosit ataupun anemia sebagaimana dinyatakan Onah *et al.* (1996) dan Herrera *et al.* (2004) juga tidak dapat dibenarkan. Kekeliruan umum yang terjadi dalam permasalahan ini adalah karena pengamatan hanya didasarkan pada pola kelompok berdasarkan nilai rata-rata seperti dilakukan oleh Onah *et al.* (1996) sehingga seolah-olah berkaitan. Apabila dilakukan penelaahan dan analisis individual maka hasil penelitian Onah *et al.* (1996) bersesuaian dengan hasil penelitian ini, namun hal itu tidak dilakukannya meskipun data tersebut nampak dengan jelas. Kesalahan lainnya adalah karena pengamatan nilai PCV dan jumlah eritrosit hanya diamati dalam satu titik waktu tertentu dan dibandingkan secara inferensial dengan kelompok hewan normal sebagaimana dilakukan Okochi *et al.* (2003) dan Mekata *et al.* (2013).

Demikian pula halnya antara pola parasitemia dan dinamika jumlah eritrosit dalam darah juga tidak selalu bersesuaian (Gambar 3A dan 3C). Hasil penelitian ini bertolak belakang dengan pernyataan Habila *et al.* (2012) dan Mbaya *et al.* (2012). Habila *et al.* (2012) menyatakan bahwa pada infeksi

yang berat, anemia berkaitan dengan adanya parasit dalam darah dan keparahan berkaitan dengan derajat dan gelombang awal parasitemia. Demikian pula halnya Mbaya *et al.* (2012) juga menyatakan bahwa pada fase akut atau subakut di rodensia, terjadinya anemia diawali dengan nampaknya *Trypanosoma* dalam darah perifer. Parasitemia umumnya tinggi, fluktuatif dan ditemukan dalam waktu beberapa hari di darah.

Sebaliknya, hasil penelitian ini sejalan dengan hasil penelitian yang diperoleh Carmona *et al.* (2006) yang melaporkan bahwa mencit yang menampakkan parasitemia tinggi, tidak berlanjut dengan anemia maupun gejala klinik. Pada setiap kasus di mencit, kematian terjadi pada periode waktu yang relatif pendek sehingga tidak sesuai sebagai model untuk studi gelombang parasitemia yang khas pada kuda (Carmona *et al.* (2006). Demikian pula pada penelitian ini, meskipun isolat Pemalang memiliki pola parasitemia undulan tetapi waktu daya hidup mencitnya masih pendek (kurang dari satu bulan). Namun perlu diketahui adanya beberapa penelitian yang melaporkan bahwa mencit tetap dapat hidup lebih dari 40 hari setelah diinfeksi isolat *T. evansi* tertentu, misalnya isolat KETRI 2480 (Baral *et al.*, 2007 dan Barkhuizen *et al.*, 2007). Hasil penelitian ini juga merupakan pengecualian sekaligus mengoreksi pernyataan Onah *et al.* (1996) yang menyatakan bahwa kematian pada trypanosomiasis umumnya akibat anemia yang berat.

KESIMPULAN

Berdasarkan penelitian ini, yaitu infeksi *T. evansi* pada mencit DDY diketahui bahwa tingginya parasitemia tidak selalu berkaitan dengan kematian dan anemia. Penurunan nilai PCV berkaitan dengan parasitemia pada infeksi *T. evansi*. Apabila parasit dapat dibunuh dengan obat maka nilai PCV akan kembali normal, baik pola maupun nilainya. Menurun ataupun rendahnya nilai PCV juga tidak selalu berhubungan dengan menurunnya jumlah eritrosit dalam darah ataupun anemia. Pada penelitian ini, kematian pada mencit yang diinfeksi

oleh *T. evansi* tidak berkaitan dengan menurunnya PCV maupun anemia.

Pada penelitian berikutnya perlu diteliti konsistensi dan keterkaitan keganasan isolat Pidie, Bangkalan dan Pemalang dengan menggunakan galur mencit yang berbeda dan respon imunopatogenisisnya, baik secara seluler maupun molekuler. Hal ini diperkirakan karena perbedaan galur mencit dan isolat *Trypanosoma* yang berbeda akan memberikan respon integratif yang mungkin berbeda.

DAFTAR PUSTAKA

- Anonimus. 2012.** *Pedoman Pengendalian dan Pemberantasan Penyakit Trypanosomiasis (Surra)*. Direktorat Kesehatan Hewan, Direktorat Jenderal Peternakan dan Kesehatan Hewan Kementerian Pertanian.
- Antoine-Moussiaux, N, S Magez and D Desmecht. 2008.** Contributions of experimental mouse models to the understanding of African trypanosomiasis. *Trends in Parasitology*. 24 (9) : 411–418.
- Baral, TN, P De Baetselier, F Brombacher and S Magez. 2007.** Control of *Trypanosoma evansi* Infection Is IgM Mediated and Does Not Require a Type I Inflammatory Response. *J. Infecti. Dis.* 195 : 1513–20.
- Barkhuizen, M, S Magez, RA Atkinson and F Brombacher. 2007.** Interleukin-12p70-Dependent Interferon-g Production Is Crucial for Resistance in African Trypanosomiasis. *J. Infecti. Dis.* 196 : 1253–60.
- Carmona, TMP, J Garrizzo, A Roschman-González, F Tejero, A Escalante and PM Aso. 2006.** Susceptibility of different mouse strains to experimental infection with a Venezuelan isolate of *Trypanosoma evansi*. *J. Protozool. Res.* 16 : 1-8.
- De-Menezes VT, AO Queiroz, MAM Gomes, MAP Marques, and AM Jansen. 2004.** *Trypanosoma evansi* in inbred and Swiss-Webster mice : distinct aspects of pathogenesis. *Parasitol Res.* 94 : 193-200
- Habila, N, MH Inuwa, IA Aimola, MU Udeh and E Haruna. 2012.** Pathogenic mechanisms of *Trypanosoma evansi* infections. *Res. Vet. Science.* 93 : 13–17.
- Hererra, HM, AMR Dávila, A Norek, UG Abreu, SS Souza, PS D'Andrea and AM Jansen. 2004.** Enzootiology of *Trypanosoma evansi* in Pantanal, Brazil. *Vet. Par.* 125 : 263–275.
- Mbaya, A, H Kumshe and CO Nwosu. 2012.** *The Mechanisms of Anaemia in Trypanosomosis: A Review, Anemia*, Dr. Donald Silverberg (Ed.), ISBN: 978-953-51-0138-3, InTech. <http://www.intechopen.com/books/anemia/the-mechanisms-of-anaemia-in-trypanosomosis-a-review>.
- Mekata, H, S Konnai, CN Mingala, NS Abes, CA Gutierrez, AP Dargantes, WH Witola, N Inoue, M Onuma, S Murata and K Ohashi. 2013.** Isolation, cloning, and pathologic analysis of *Trypanosoma evansi* field isolates. *Parasitol. Res.* DOI 10.1007/s00436-013-3297-3.
- Okochi, VI, J Okpuzor, MO Okubena and AK Awoyemi. 2003.** The influence of African Herbal Formula on the haematological parameters of *Trypanosome* infected rats. *African J. Biotech.* 2 (9) : 312–316.
- Onah, DN, J Hopkins and AG Luckins. 1996.** Haematological changes in sheep experimentally infected with *Trypanosoma evansi*. *Parasitol. Res.* 82 : 659–663.
- Subekti, DT, DH Sawitri, Suhardono and, AH Wardhana. 2013.** Pola Parasitemia dan Kematian Mencit yang Diinfeksi *Trypanosoma evansi* isolat Indonesia. *JITV* 18 (4): 274-290.
- Takeet, MI and BO Fagbemi. 2009.** Haematological, Pathological and Plasma Biochemical Changes in Rabbits Experimentally Infected with *Trypanosoma congolense*. *ScientificWorldJournal.* 4 (2) : 29-36.
- Verdillo, JCM, JV Lazaro, NS Abes and CN Mingala. 2012.** Comparative virulence of three *Trypanosoma evansi* isolates from water buffaloes in the Philippines. *Exp. Par.* 130 : 130–134.