

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	i
PERNYATAAN	iii
KATA PENGANTAR	iv
DAFTAR ISI.....	vii
HALAMAN JUDUL i.....	vii
DAFTAR TABEL.....	x
DAFTAR GAMBAR.....	xi
DAFTAR LAMPIRAN.....	xv
BAB I. PENDAHULUAN	1
A. Latar Belakang	1
B. Perumusan Masalah.....	7
C. Tujuan Penelitian	7
D. Keaslian Penelitian.....	8
E. Manfaat Penelitian	11
BAB II. TINJAUAN PUSTAKA	12
A. Trypanosomiasis	12
B. Etiologi.....	12
C. Klasifikasi <i>Trypanosoma evansi</i>	13
D. Struktur dan Morfologi.....	15
E. Siklus Hidup <i>Trypanosoma evansi</i>	17
F. Penularan.....	18
G. Gejala Klinis dan Patogenesis.....	19
H. Epidemiologi Surra	20
I. <i>Trypanosoma evansi</i> sebagai penyakit zoonotik.....	22
J. Diagnosa Surra	25
K. Pemisahan <i>T. evansi</i> dari lekosit dan eritrosit	28
L. Pencegahan dan Kontrol Surra	31
M. Kontrol Menggunakan Trypanosidal.....	31
N. Protein <i>Transporter</i>	37
O. Pohon Filogenetik keluarga gen ENT	41
P. Metode Pendeteksian Resistensi Trypanosidal.....	43

Q. Landasan Teori	45
R. Kerangka Teori	48
S. Kerangka Konsep	49
T. Hipotesis	50
BAB III. METODE PENELITIAN	51
A. Jenis dan Rancangan Penelitian	51
B. Waktu dan Tempat Penelitian	51
C. Subyek Penelitian	52
D. Variabel Penelitian	52
E. Definisi Operasional	52
F. Alat dan Bahan Penelitian	53
G. Jalannya Penelitian	56
1. Pengambilan Isolat <i>T. evansi</i> dari Kerbau	57
2. Perbanyakkan <i>T. evansi</i>	57
3. Pembuatan Sediaan Obat Injeksi DA	57
4. Uji sensitivitas <i>T. evansi</i> terhadap obat DA	58
5. Koleksi darah mencit	62
6. Pemisahan dan pemurnian <i>T. evansi</i> dari darah	62
7. Isolasi genom DNA dari pelet <i>T. evansi</i>	63
8. Pengecekan kualitas DNA	64
9. Amplifikasi dengan teknik PCR	64
10. Elektroforesis DNA	65
11. Sekuensing DNA	66
H. Analisis Hasil	67
BAB IV. HASIL DAN PEMBAHASAN	68
A. Hasil Penelitian	68
1. Perbanyakkan <i>T. evansi</i> secara <i>in vivo</i> pada mencit	68
2. Morfologi <i>T. evansi</i>	68
3. Hasil pemisahan dan pemurnian <i>T. evansi</i> dari darah	69
4. Efektivitas obat DA terhadap <i>T. evansi</i> uji secara <i>in vivo</i>	71
5. Hasil ekstraksi dan pengecekan konsentrasi DNA	73
6. Hasil amplifikasi gen ITS tanpa pemisahan <i>T. evansi</i> dari darah	73
7. Hasil sekuensing gen ITS tanpa pemisahan <i>T. evansi</i> dari darah	74

8. Hasil amplifikasi DNA gen ITS hasil pemisahan <i>T. evansi</i> dari darah dengan larutan Hayem dan Turk.....	75
9. Hasil amplifikasi DNA gen TevAT1 tanpa pemisahan <i>T. evansi</i> dari darah.....	75
10. Hasil sekuensing DNA gen TevAT1 tanpa pemisahan <i>T. evansi</i> dari darah.....	76
11. Amplifikasi gen TevAT1 penyandi adenosin transporter 1 hasil pemisahan dengan larutan Hayem dan Lekosit	77
12. Hasil sekuensing gen ITS dengan sanger sekuensing.....	77
13. Hasil sekuensing gen TevAT1 dengan metode sanger sekuensing	81
B. Pembahasan.....	87
1. Perbanyakkan <i>T. evansi</i>	87
2. Pemisahan dan pemurnian <i>T. evansi</i> dari darah.....	87
4. Perbedaan hasil filogenetik menggunakan ITS 1 dan ITS 2	91
5. Efektivitas DA terhadap <i>T. evansi</i> dengan uji <i>in vivo</i>	94
6. Deteksi molekuler gen TevAT1 penyandi <i>adenosine transporter</i> 1	97
C. Keterbatasan penelitian	102
BAB V. KESIMPULAN DAN SARAN	103
DAFTAR PUSTAKA	105
LAMPIRAN.....	118

DAFTAR TABEL

Halaman

Tabel 1. Kasus Surra pada manusia (atypical human trypanosomiasis) yang terjadi di beberapa negara	3
Tabel 2. Klasifikasi <i>T. evansi</i>	14
Tabel 4. Karakteristik farmakologi dari sistem transport adenosin <i>Trypanosoma</i> sp.	39
Tabel 5. Perbedaan utama antara dosis tunggal dan multi tes dosis pada mencit	44
Tabel 6. Hasil Perhitungan dosis konversi dari <i>Ruminant Equivalent Doses</i> (RED) ke <i>Animal Equivalent Doses</i> (AED)	58
Tabel 7. Penghitungan rasional untuk jumlah <i>T. evansi</i> menggunakan WBF dari tikus yang trinfeksi pada perbesaran 400 kali.	60
Tabel 8. Keberadaan parasit dalam satu lapang pandang	61
Tabel 9. Efektivitas DA terhadap isolat <i>T. evansi</i>	71
Tabel 10. Hasil penelitian hewan coba yang diinfeksi isolat <i>Tevansi</i> isolat Ngawi, diobati dengan DA.	71
Tabel 11. Komposisi nukleotida sekuen ITS-1 <i>T. evansi</i>	78
Tabel 12. Komposisi nukleotida sekuen ITS-2 <i>T. evansi</i>	78
Tabel 13. Analisis sekuen ITS <i>T. evansi</i> menggunakan BLAST	79
Tabel 14. Komposisi nukleotida sekuen gen <i>TevAT1</i>	82
Tabel 15. Analisis sekuen gen <i>TevAT1</i> menggunakan BLAST	82
Tabel 16. Identitas urutan gen <i>TevAT1</i> dari GenBank.....	83
Tabel 17. Matrik perbedaan nukleotida sekuen gen <i>TevAT1</i> penyandi adenosin transporter penelitian dengan sekuen gen penyandi adenosin transporter dari GenBank.	83
Tabel 18. Perbedaan nukleotida gen <i>TevAT1 T. evansi</i> isolat dari kerbau dibandingkan dengan nukleotida gen <i>TevAT1 T. evansi</i> isolat dari Rusa dan Unta	83
Tabel 19. Perbedaan asam amino gen <i>TevAT1 T. evansi</i> isolat dari kerbau dibandingkan dengan asam amino gen <i>TevAT1 T. evansi</i> isolat dari Rusa dan Unta.	84
Tabel 20. Identitas urutan gen <i>Trypanosoma</i> sp yang resisten	84
Tabel 21. Matrik perbedaan nukleotida sekuen gen <i>TevAT1</i> penyandi adenosin transporter penelitian dengan sekuen gen penyandi adenosin transporter dari GenBank.	84
Tabel 22. Perbedaan nukleotida gen <i>TbAT1</i> isolat dari kerbau sensitif terhadap obat DA dibandingkan dengan nukleotida gen <i>AT1 T. brucei</i>	84
Tabel 23. Perbedaan nukleotida gen <i>TevAT1 T. evansi</i> isolat dari kerbau sensitif terhadap obat DA dibandingkan dengan nukleotida gen <i>AT1 T. brucei</i> dan <i>T. equiperdum</i> isolat dari rusa dan unta yang resisten DA	85
Tabel 24. Perbedaan asam amino gen <i>TevAT1 T. evansi</i> isolat dari kerbau sensitif terhadap obat DA dibandingkan dengan protein gen <i>AT1 T. brucei</i> dan <i>T. equiperdum</i> isolat dari rusa dan unta yang resisten DA.	85
Tabel 25. Identitas urutan gen <i>Trypanosoma</i> sp yang sensitif	86
Tabel 26. Matrik perbedaan nukleotida sekuen gen <i>TevAT1</i> penyandi adenosin transporter penelitian dengan sekuen gen penyandi adenosin transporter dari GenBank.	86

DAFTAR GAMBAR

Halaman

Gambar 1. Pohon filogenetik subgenus Trypanozoon (Desquesnes et al., 2013)	15
Gambar 2. Morfologi <i>T. evansi</i> (Hunt, 2010).....	16
Gambar 3. Morfologi <i>T. evansi</i> dengan apusan darah tipis	17
Gambar 4. Cara binary longitudinal fission (Ventura et al., 2000).....	18
Gambar 5. Beberapa vektor potensial <i>T. evansi</i> (Desquesnes et al., 2013)	19
Gambar 6. Sapi yang terinfeksi menunjukkan tanda-tanda kronis (NAQS., 2016)	20
Gambar 7. Kuda yang terinfeksi menunjukkan tanda-tanda kronis (NAQS., 2016).....	20
Gambar 8. Ilustrasi kejadian Surra di Indonesia yang dikumpulkan dari berbagai instansi di Indonesia (Yuniarto, 2016).....	22
Gambar 9. Lokasi ITS-1 dan ITS-2 (Thumbi et al., 2008).	27
Gambar 10. Darah yang mengandung sel, protein, dan gula . Plasma darah pada fase atas, lapisan buffy yang merupakan lapisan tipis leukosit (sel darah putih) dicampur dengan trombosit di tengah, dan eritrosit (sel darah merah) di bagian bawah tabung (Dean, 2005).....	30
Gambar 11. DNA kinetoplas (kDNA) dengan enzim replikasinya dan mekanisme aksi DA (da Silva Oliveira & de Freitas, 2015).....	34
Gambar 12. Faktor penyebab kejadian resistensi obat (Peregrine et al., 1990).....	37
Gambar 13. Representasi skematik dari keragaman protein transport membran (Dean et al., 2014).....	38
Gambar 14. Produk gen yang memediasi obat pada <i>T. brucei</i> (Mayers et al., 2017).....	40
Gambar 15. Perbedaan penyerapan DA oleh <i>Babesia gibsoni</i> pada isolat yang resisten dan wild-type (Ymasaki et al., 2017)	41
Gambar 16. Pohon filogenetik dari keluarga gen ENT pada spesies <i>Trypanosoma</i> sp. (Munday et al., 2013).....	42
Gambar 17. Bagan Jalannya Penelitian	56
Gambar 18. Morfologi <i>T. evansi</i> asal Ngawi (masih terdapat eritrosit dan lekosit) pada mencit kontrol hari ke-3 pasca infeksi (► : nucleus) (Dokumentasi Penelitian).....	69
Gambar 19. Hasil pemeriksaan <i>Wet Blood Film T. evansi</i> isolat asal Ngawi (Kerbau) (Sumber : Dokumentasi penelitian).....	69
Gambar 20. Morfologi <i>T. evansi</i> asal Ngawi (masih terdapat lekosit) pada mencit kontrol hari ke-3 pasca infeksi (► : Lekosit)	70
Gambar 21. Morfologi <i>T. evansi</i> asal Ngawi (tanpa Eritrosit dan Lekosit) pada mencit kontrol hari ke-3 pasca infeksi	70
Gambar 22. Total kesembuhan hewan coba mencit terhadap DA dengan dosis 1,3,5 dan 7 mg/kg BB.....	72
Gambar 23. Pengaruh dosis terhadap tingkat kematian mecit yang diinfeksi.....	72
Gambar 24. Hasil elektroforesis amplifikasi DNA <i>T. evansi</i> gen small subunit rRNA, ITS 1, gen 5.8S rRNA, ITS 2 dan gen large subunit rRNA tanpa pemisahan dari darah	73

Gambar 25. Hasil sekuensing amplifikasi DNA <i>T. evansi</i> gen small subunit rRNA, ITS 1, gen 5.8S rRNA, ITS 2 dan gen large subunit rRNA tanpa pemisahan dari darah	74
Gambar 26. Hasil elektroforesis amplifikasi DNA <i>T. evansi</i> gen small subunit rRNA, ITS 1, gen 5.8S rRNA, ITS 2 dan gen large subunit rRNA dengan pemisahan dengan larutan Hayem dan Turk	75
Gambar 27. Hasil elektroforesis amplifikasi DNA <i>T. evansi</i> gen adenosine transporter 1 gen <i>TevAT1</i> isolat dari Kerbau tanpa pemisahan <i>T. evansi</i> dari darah.....	75
Gambar 28. Hasil sekuensing DNA <i>T. evansi</i> gen adenosine transporter 1 gen <i>TevAT1</i> isolat dari Kerbau tanpa pemisahan <i>T. evansi</i> dari darah	76
Gambar 29. Elektroforesis hasil amplifikasi DNA <i>T. evansi</i> gen adenosine transporter 1 gen <i>TevAT1</i> isolat dari Kerbau dengan pemisahan dengan larutan Hayem dan Turk.....	77
Gambar 30. Urutan sekuen gen <i>T. evansi</i> gen small subunit rRNA, ITS 1, gen 5.8S rRNA, ITS 2 dan gen large subunit rRNA isolat dari Kerbau (MK246125.1)	77
Gambar 31. Pohon filogenetik berdasarkan sekuen ITS total <i>T. evansi</i> dengan metode <i>Maximum Parsimony</i> 1000x bootstrap.....	80
Gambar 32. Pohon filogenetik berdasarkan sekuen ITS 1 <i>T. evansi</i> dengan metode <i>Maximum Parsimony</i> 1000x bootstrap.....	80
Gambar 33. Pohon filogenetik berdasarkan sekuen ITS 2 <i>T. evansi</i> dengan metode <i>Maximum Parsimony</i> 1000x bootstrap.....	81
Gambar 34. Urutan sekuen <i>T. evansi</i> gen <i>TevAT1</i> isolat dari Kerbau	81
Gambar 35. Urutan sekuen <i>T. evansi</i> adenosine transporter 1 gen <i>TevAT1</i> isolat dari Kerbau (AZN25352.1).....	82

DAFTAR SINGKATAN

ACE	: <i>angiotensin converting enzyme</i>
ASIC	: <i>acid-sensitive ion</i>
channels BCT	: <i>Buffy Coat Technique</i>
BLAST	: <i>Basic Local Aligmen Search Tool</i>
Bp	: <i>Base pairs</i>
CD	: <i>cluster differentiation</i>
DA	: <i>Diminazene Aceturate</i>
DNA	: <i>Deoxy ribonucleic Acid</i>
EDTA	: <i>Ethylene Diamine Tetraacetic</i>
Acid ELISA	: <i>Enzyme Linked Immunosorbent</i>
Assay ERK	: <i>extracellular-regulated kinases</i>
ESAG6/7	: <i>Expression site associated gene 6/7</i>
IL	: <i>Inter Leukin</i>
ITS-1	: <i>Internal transcribed spacer 1</i>
ITS-2	: <i>Internal transcribed spacer 2</i>
kDNA	: <i>Kinetoplast Deoxy ribonucleic Acid</i>
LPS	: <i>Lipopolysaccharide</i>
MAECT	: <i>Modified miniature anion-exchange centrifugation technique</i>
MAPK	: <i>Mitogen-activated protein kinase</i>
MEGA	: <i>Molecular Evolutionary Genetics Analysis</i>
MHCT	: <i>Microhaematocrit Centrifugation Technique</i>
MI	: <i>Mouse inoculation</i>
MHCT	: <i>Microhaematocrit Centrifugation Technique</i>
MI	: <i>Mouse Inoculation</i>
NFκB	: <i>Nuclear factor κB .</i>
OIE	: <i>Office International des Epizooties</i>
PCR	: <i>Polymerase Chain Reaction</i>
PCV	: <i>Packed Cell Volume</i>
RAS	: <i>renin angiotensin system</i>
RNA	: <i>ribonukleic Acid</i>
Ro Tat	: <i>Rode Trypanozoon antigen type</i>
ROS	: <i>reactive oxygen species</i>
SOCS	: <i>Suppressor of Cytokine Signaling</i>
SSE	: <i>Structure-specific endonuclease</i>
STAT	: <i>signal transducers and activators of transcription</i>
TARF	: <i>TNF receptor associated factor</i>
TBE	: <i>Tris Borate EDTA</i>
TE	: <i>Tris EDTA</i>
TIRAP	: <i>TIR domain-containing adapter protein</i>
TLR	: <i>Toll-like receptors</i>
TNF	: <i>Tumor necrosis factor</i>
UMSBP	: <i>unit minicircle binding protein</i>



UNIVERSITAS
GADJAH MADA

UJI SENSITIVITAS Trypanosoma evansi TERHADAP OBAT DIMINAZENE ACETURATE SECARA IN VIVO PADA MENCIT (Mus musculus) DAN DETEKSI MOLEKULER INTERNAL TRANSCRIBED SPACER (ITS) DAN GEN TevAT1 PENYANDI ADENOSINE TRANSPORTER

AHMAD FAHRURROZI. ZS, Prof. drh. Widya Asmara, SU., Ph.D, Dr. drh. R. Wisnu Nurcahyo
Universitas Gadjah Mada, 2019 | Diunduh dari <http://etd.repository.ugm.ac.id/>

UV	: <i>Ultra Violet</i>
VAT	: <i>Variable Antigen Type</i>
VSG	: <i>Variance Surface Glycoprotein</i>
WBF	: <i>Wet Blood Film</i>

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Hasil BLAST primer <i>forward</i> gen TevAT1	118
Lampiran 2. Panjang amplikon dan TM primer TevAT1	118
Lampiran 3. Data Genbank sekuen ITS <i>T. evansi</i>	118
Lampiran 4. BLAST ITS.....	119
Lampiran 5. Data Genbank gen TevAT1 penyandi anedodin transporter 1	120
Lampiran 6. Analisis sekuen gen TevAT1 menggunakan BLAST.....	120
Lampiran 7. Hasil analisis Regresi Probit	121
Lampiran 8. Hasil aligment gen TevAT1 dari data GenBank	125
Lampiran 9. <i>T. evansi</i> dengan Trypanosoma sp.	126
Lampiran 10. Multiple sequence alignment dari sekuen asam amino gen TevAT1 dengan Clustal W.	128
Lampiran 11. Ethical Clearance	131