

Pelacakan dosis tunggal tripanosidal diminazen aseturat pada mencit yang diinfeksi dengan tripanosoma

Single dose trypanocide surveillance of diminazene acetate on mice infected by trypanosoma

Mochamad Lazuardi

Sub Bagian Farmasi-Veteriner, Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga

Abstrak

Diminazene aseturat adalah satu dari sejumlah senyawa terbatas yang telah diperjualbelikan dipasaran untuk pengobatan kasus infeksi parasit darah eukariotik diantaranya seperti Leishmania dan Trypanosoma. Penelitian ini dilakukan menggunakan rancangan pasca perlakuan dengan grup kontrol dengan tujuan untuk menemukan dosis terapeutik tunggal terhadap parasit darah eukariot. Serial dosis yang digunakan dalam penelitian ini pada rentang 1,5 hingga 4 mg/kg berat badan yang diberikan secara intraperitoneal pada mencit (*Mus musculus albinus*) terinfeksi *Trypanosoma evansi* isolat Bangkalan. Hasil penelitian menunjukkan dosis minimum terapeutik pemberian tunggal diperoleh pada 3,5 mg/kg berat badan ($p<0,05$). Hasil penelitian dapat disarankan agar penggunaan diminazene aseturat pada kasus parasitemia menggunakan dosis ganda lebih dari 3,5 mg/kg berat badan.

Kata kunci : Diminazene aseturat, *T. evansi*, Haemoflagelata

Abstract

Diminazene acetate is one of a limited number compounds currently market for treatment infection cases of infection blood eucaryot parasites like a Leishmania, and Trypanosoma. The research design of this research was post test only control groups design for founding single therapeutics dose of the eukariot parasite blood. The serial range dose of this research was used at 1,5 to 4 mg/kg bw by intraperitoneal administrated to infected mice (*Mus musculus albinus*) of the *Trypanosoma evansi* Bangkalan isolates. The result of this research showed the minimum single therapeutics dose at 3,5 mg/kg bw ($p<0.05$). The recommended of this result research was application of diminazene acetate in parasitemia cases better using by multiple dose at more than 3.5 mg/mg bw.

Key words : Diminazene acetate, *T. evansi*, Haemoflagelates

Pendahuluan

Diminazene aseturat merupakan salahsatu kemoterapi antiparasit darah eukariot golongan diamidin aromatik yang pertama kali disintesis di Jerman 1950-an untuk penyakit parasit darah (Budavari *et al.*, 1989). Golongan diamidin aromatik pada penggunaan klinik kasus trypanosomiasis termasuk Chagaz diseases, cocok digunakan untuk awal infeksi (Kanmogne *et al.*, 1996).

Dosis terapi setiap kerabat parasit darah eukariot yang mampu dieliminasi oleh diminzen aseturat memiliki keragaman yang cukup tinggi. Hal tersebut diakibatkan oleh beberapa faktor dan salahsatunya adalah kecepatan kemampuan parasit mengubah-ubah protein target aksi obat (Artama *et al.*, 1992). Fenomena tersebut pada akhirnya membutuhkan dua jenis upaya pengkajian dosis yaitu (1) selalu mencari dosis terapi efektif dan (2) melakukan reevaluasi

dosis terapi yang telah diketahui (Afework et al., 2000). Badan Kesehatan Dunia sejak tahun 1996 telah menetapkan suatu keharusan upaya mengenai pengkajian dosis terhadap kemoterapi anti-parasit (*The Program Against African Trypano-somiasis*, 1996).

Berdasarkan latar belakang tersebut di atas, maka dilakukan penelitian mengenai hubungan dosis terkait dengan respon anti-parasit pemberian tunggal diminazin aseturat. Tujuan penelitian dimaksudkan adalah melakukan pencarian dosis efektif (dosis terapi) sebagai antiparasit.

Metodologi

Dalam penggerjaan penelitian rancangan yang digunakan adalah pasca perlakuan dengan grup kontrol. Variabel bebas : parasit dan diminazin aseturat, variabel tergantung : pengamatan parasitemia pada subyek terinfeksi pasca pengobatan.

Parasit darah adalah *Tripanosoma evansi* isolat Bangkalan (Bakit 87/649), hasil isolasi dari Balai Penelitian Veteriner, Bogor. Mencit (*mus musculus albino*) diperoleh dari Pusat Veterina Farma, Surabaya (turunan pertama, jantan, sehat, usia 1-2 bulan, berat 20-30 g). Sediaan farmasetik (Berenil) berupa injeksi kemasan vial 20 ml, mengandung 70 mg diminazin aseturat tiap ml (diperoleh dari PT Intervet-Indonesia, Jakarta). Stabilat Phosphat Bufer Glucose (PBG) 10 % dengan pH 7,2.

Serial dosis yang bakal dilacak adalah 1,5 hingga 4 mg/kg berat badan didasarkan pertimbangan hasil penelitian Silayo *et al.*, (1992) dan Mamman *et al.*, (1995). Jumlah mencit yang digunakan (N) tiap dosis dari serial rentang dosis, mengikuti persamaan I (*World Health Organization*, 1992).

Dalam persamaan 1, Z_1 adalah $(Z_{1-\alpha/2})^2 = Z_{0.95} = 1,96$ pada tingkat kesalahan (E) = 0,86 ekor, penyimpangan (S) = 0,88 (Soeharmi *et al.*, 2003). Hasil penghitungan pada persamaan 1 akan menghasilkan harga $N = 4,02$ dan dengan pembulatan nilai akan diperoleh jumlah mencit (N) 4 ekor.

Persamaan 1

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

Definisi Operasional Variabel

- Analisis kemampuan daya eliminasi parasit : dilakukan secara *whole blood film* (WBF) dari v. cocygea dan pemeriksaan WBF menggunakan

mikroskop cahaya pembesaran 200 X. (Prastyawati, 1989).

- Pengamatan daya tripnosidal : dilakukan mengikuti pola huruf S seperti uraian Coles (1986) dalam mengamati struktur mikroskopik organ tubuh.
- Keberadaan parasit dalam satu lapang pandang : mengikuti aturan modifikasi dari Raina *et al.*, (1985) (Tabel I).

Tabel I. Kriteria parasitemia

| No | Pengamatan dalam satu lapang pandang (pembesaran 200x) | Kriteria parasitemia |
|----|--|----------------------|
| 1. | Terdapat 1-5 Tripanosoma | 1+ |
| 2. | Terdapat 6-10 Tripanosoma | 2+ |
| 3. | Terdapat 11-20 Tripanosoma | 3+ |
| 4. | Terdapat > 20 Tripanosoma | 4+ |

Jalan penelitian

- Dilakukan pemilahan subkelompok mencit perlakuan tiap perwakilan dosis (1,5, 1,6, 1,7, 2, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3, 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8, 3,9 dan 4 mg/kg berat badan), sehingga setiap dosis mengandung 4 ekor (1^{abcd} hingga 20^{abcd}). Dilakukan pemilahan kelompok mencit kontrol sebanyak 20 subkelompok mengandung 4 ekor setiap subkelompok.
- Seluruh mencit dilakukan infeksi parasit secara intra peritoneal (dalam stabilat Phosphat Bufer Gliserol) dengan dosis 0,2-0,3 ml mengandung 10⁵ Trip/ml. Pasca infeksi dilakukan pemeriksaan parasitemia tiap hari secara *whole blood film* dengan kriteria lapangan pandang seperti paparan Raina *et al.* (1985).
- Bila telah ditemui parasitemia positif empat seperti kriteria Raina *et al.*, (1985), kelompok perlakuan dilakukan pengobatan secara intra peritoneal (IP) dengan dosis berturut-turut 1,5, 1,6, 1,7, 2, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3, 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8, 3,9 dan 4 mg/kg berat badan. Kelompok kontrol tak diberi pengobatan namun hanya disuntikan PBG 0,2 ml (plasebo) setiap ekor tertular.
- Kelompok perlakuan dilakukan pemeriksaan derajat eliminasi parasitemia secara WBF setiap hari hingga hari ke 12 pasca pengobatan. Kelompok kontrol dilakukan pengamatan perkembangan parasitemia secara WBF setiap hari hingga hari ke 12 pasca pemberian plasebo dan dilakukan pencatatan waktu kematian mencit
- Data yang diperoleh dari kelompok perlakuan adalah jumlah kematian dan jumlah hidup dari masing-masing dosis uji, selanjutnya dilakukan penghitungan keberhasilan daya tripnosidal (%). Data dari kelompok kontrol

adalah antigenitas parasit yaitu daya patogenitas parasit yang menyebabkan mencit tak mampu bertahan hidup.

6. Data seluruh hasil penelitian mengenai jumlah kematian mencit dan jumlah mencit yang masih bertahan hidup dikomparasikan dengan seluruh kelompok kontrol menggunakan uji eksak Fisher SPSS 12.0 siknifikansi 0,05.

Hasil Dan Pembahasan

Hasil penelitian menunjukan daya eliminasi pertama kali didapatkan pada dosis 2,9 mg/kg berat badan disusul berturut-turut 3 mg/kg berat badan hingga 3,4 mg/kg berat badan. Dosis pemberian 2,9 mg/kg berat badan masih bersifat tripanostatik mengingat hingga hari ke 10, ternyata muncul kekambuhan kembali. Dosis 3 hingga 3,5 mg/kg berat badan hingga hari ke 10 rentang kemunculan kekambuhan pada subyek mencit relatif lebih pendek dibanding pada dosis 2,9 mg/kg berat

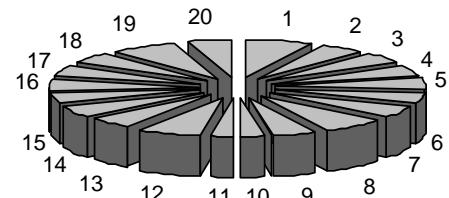
badan. Sehingga dosis 3,5 mg/kg berat badan dirasakan cocok ditetapkan sebagai dosis minimum terapeutik (Tabel II). Dosis 3,5 mg/kg berat badan pernah dicobakan terhadap *T. congolense* pada kambing, ternyata menghasilkan daya tripanosidal kuat (Silayo *et al.*, 1992). Penggunaan dosis 3,5 mg untuk *T. b brucei* juga dicobakan untuk tindakan terapi dengan hasil mampu bersifat tripanosidal (Anika, Onyeyili, 1989). Studi lanjutan oleh Afewerk *et al.*, (2000) menunjukan *T. congolense* yang telah resisten terhadap golongan kemotripanosidal jenis pentamidin (isometamidium klorida) akan dapat dieliminasi pada pemberian diminazen aseturat 3,5 mg/kg berat badan.

Dosis 4 mg/kg berat badan dirasakan aman dan dapat digunakan sebagai dosis terapi untuk jenis parasit darah eukariot kerabat Tripanosoma. Kemunculan kekambuhan infeksi pasca pemberian diminazen aseturat pada

Tabel II. Pelacakan dosis tunggal diminazen aseturat (kel. perlakuan)

| Dosis (mg.kg bb ⁻¹) | Rerata kejadian parasitemia pasca pengobatan (hari) | Rerata terjadi kemunculan parasitemia pasca pengobatan (hari) | Rerata kematian akibat infeksi pasca pengobatan (hari) | Hidup/ Mati | Daya Tripanosidal (%) |
|------------------------------------|---|--|--|----------------|-----------------------------|
| 1,5 | 2,75 ± 1,09 | 0,00 | 3,75 ± 1,09 | 0/4 | 0 |
| 1,6 | 4,50 ± 2,29 | 1,75 ± 1,78 | 7,25 ± 3,83 | 0/4 | 0 |
| 1,7 | 3,00 ± 1,00 | 2,50 ± 2,87 | 6,50 ± 3,35 | 0/4 | 0 |
| 2,0 | 2,75 ± 0,83 | 4,00 ± 4,06 | 7,75 ± 4,26 | 0/4 | 0 |
| 2,5 | 3,50 ± 1,12 | 3,75 ± 2,49 | 8,25 ± 3,03 | 0/4 | 0 |
| 2,6 | 6,75 ± 1,30 | 2,75 ± 1,64 | 10,50 ± 0,50 | 0/4 | 0 |
| 2,7 | 6,50 ± 1,80 | 2,25 ± 2,28 | 9,75 ± 2,86 | 0/4 | 0 |
| 2,8 | 7,00 ± 0,71 | 2,25 ± 2,28 | 10,25 ± 1,78 | 0/4 | 0 |
| 2,9 | 5,00 ± 1,41 | 3,25 ± 2,16 | 8,25 ± 4,91 | 1/3 | 25 |
| 3,0 | 4,00 ± 1,22 | 2,50 ± 2,60 | 5,50 ± 5,50 | 2/2 | 50 |
| 3,1 | 2,25 ± 1,30 | 1,25 ± 2,16 | 2,50 ± 4,33 | 3/1 | 75 |
| 3,2 | 2,75 ± 0,43 | 2,00 ± 3,46 | 3,00 ± 5,20 | 3/1 | 75 |
| 3,3 | 2,50 ± 0,87 | 1,25 ± 2,16 | 2,50 ± 4,33 | 3/1 | 75 |
| 3,4 | 2,25 ± 0,43 | 2,00 ± 3,46 | 3,00 ± 5,20 | 3/1 | 75 |
| 3,5 | 1,75 ± 0,43 | 0,00 | 0,00 | 4/0 | 100 |
| 3,6 | 1,25 ± 0,43 | 0,00 | 0,00 | 4/0 | 100 |
| 3,7 | 1,25 ± 0,43 | 0,00 | 0,00 | 4/0 | 100 |
| 3,8 | 1,00 | 0,00 | 0,00 | 4/0 | 100 |
| 3,9 | 1,00 | 0,00 | 0,00 | 4/0 | 100 |
| 4,0 | 1,00 | 0,00 | 0,00 | 4/0 | 100 |
| Jumlah total Hidup/Mati | | | | 39/41 | |

dasarnya telah diungatkan oleh Peregrine dan Mamman (1993), sekaligus sebagai bentuk ketidakmampuan kemoterapi bersifat paratisidal. Croos (2001) menguraikan bahwa resistensi dapat terpicu akibat tindakan pemberian obat tak berkecukupan dosis sehingga menghasilkan aksi pengobatan yang bersifat subterapeutik. Bila ditinjau dari keadaan kelompok kontrol, ternyata rerata mencit mati dalam waktu 2-3 hari pasca infeksi (Gambar 1). Kejadian

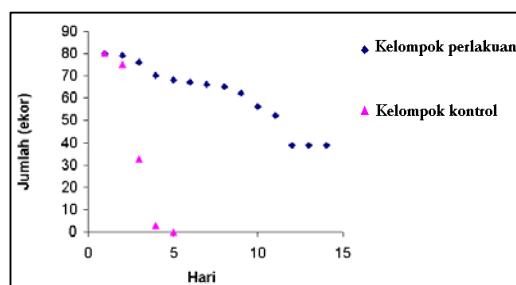


Gambar 1. Rentang lama hidup ke 80 ekor mencit terinfeksi pada kelompok kontrol hanya bertahan antara 2-4 hari.

tersebut menunjukkan bahwa keganasan parasit terhadap mencit cukup patogenik.

Pada Gambar 2 nyata sekali bahwa kecukupan dosis mampu menyelamatkan jumlah mencit dari kematian akibat infeksi parasit ($p<0,05$), terutama dimulai tampak sejak dosis 2,9 mg/kg berat badan dengan rerata tingkat parasitemia makin menurun (Tabel II). Pada Tabel II menunjukkan keadaan parasitemia

mencit terinfeksi makin menunjukkan penurunan nyata hingga berjumlah tetap sejak dosis mencapai 3,8 mg/kg berat badan. Namun pada batas dosis 3,5 mg/kg berat badan sudah tidak ditemui mencit yang mengalami kematian dengan demikian awal eliminasi nyata terjadi pada dosis 3,5 mg/kg berat badan.



Gambar 2. Jumlah mencit terinfeksi pada kelompok kontrol sejak hari ke 1 (80 ekor) hingga hari ke 4 terus menyusut dan pada hari ke 5 tak ditemui mencit yang masih bertahan hidup (0 ekor). Pada kelompok perlakuan dengan jumlah awal 80 ekor, jumlah kematian mencit terinfeksi pasca pengobatan sejak hari ke 1 hingga ke 11 terus menurun (41 ekor) dan tetap bertahan sejak hari ke 12 sebanyak 39 ekor ($p<0,05$).

Patogenitas *T. evansi* isolat Bangkalan pada mencit bila dibandingkan dengan laporan dari Afewerk *et al.*, (2000), yang menggunakan isolat *T. congolense* dengan infeksi 10^6 trip/ml mampu bertahan hingga 5-7 hari. Perbandingan tersebut menunjukkan bahwa isolat parasit yang digunakan belum mengalami perubahan *protein surface antigenic* (PSA) yang khas dimiliki oleh kerabat trypanosoma. PSA mudah sekali mengalami perubahan dengan implikasi penurunan daya patogenitas atau sebaliknya.

Kesimpulan

Dosis diminazen aseturat berdaya tripanosidal untuk *T. evansi* isolat Bangkalan paling aman diberikan di atas dosis 3,5 mg/kg berat badan..

Daftar Pustaka

- Afework, Y., Clausen P.H., Abebe G., Tilahun G., Mehlitz D., 2000, Multiple-drug Resistant Trypanosoma congolense Populations In Village Cattle of Metekel District, North-West Ethiopia. *Acta Tropica*, 76: 231-238.

- Anika, S.M., Onyeyili, P.A., 1989, Effects of trypanosomal infection on the pharmacokinetics of diminazene aceturate in dogs. *Trop. Med. Parasitol.*, Dec; 40 (4): 419-421.
- Artama, W.T., Sardjono, B., Trini, S., Rini W., 1992, Produksi Antibodi Monoklonal Terhadap Antigen Permukaan Trypanosoma evansi. *Laporan Penelitian*. Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Gadjah Mada. Yogyakarta, 3-25.
- Budavari, S., O'Neil, M.J., Smith A., Heckelman P.E., 1989, *The Merck Index : An encyclopedia of chemical drugs and biologicals*. 11th edition. Merck and Co., Inc. Ran way, New Jersey, USA, 3261.
- Coles, E.H., 1986, *Veterinary Clinical Pathology*. 4th edition. WB Saunder Company, The Curtis Cebter Independence Square West, Philadelphia, PA 19106, USA, 56-141.
- Cross, G.A.M., 2001, African Trypanosomes In The 21st Century : What is Their Future in Science and In Health ? *Int. J. for Parasitol.*, 31: 427-433.
- Kanmogne, G.D., Asonganyi, T., and Gibson W.C., 1996, Detection of Trypanosoma brucei gambiense, In Serologically Positive but Aparasitaemic Sleeping-Sickness Suspect In Cameroon, by PCR. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*. 90 (5): 475-483.
- Mamman, M., Gettinby, G., Murphy, N.B., Kemei, S., Peregrine, A.S., 1995, Frequency of Diminazene-resistant trypanosomes in populations of Trypanosoma congolense arising in infected animals following treatment with Diminazene aceturate. *Antimicrob. Agents Chemother.*, May ; 39 (5): 1107-1113.
- Peregrine, A.S and Mamman, M., 1993, Pharmacology of Diminazene : a review. *Acta Tropica*, 54: 185-203.
- Prastyawati, I.S., 1989, *Blood Parasites of Large Ruminants* : Sixth International Course in Diagnosis of Animal Diseases and Their Control Programme. Research Institute for Veterinary Science, Bogor
- Raina, A.K., Rakhesh Kumar, V.S, Rajora., Sridhar, R.P Sing., 1985, Oral Transmission of Trypanosoma evansi Infection In Dogs and Mice. *Vet. Parasitol.*, 18: 67-69.
- Silayo, R.S., Mamman, M., S.K. Moloo., Y.O. Aliu., M.A. Gray., A.S. Peregrine., 1992, Response of *Trypanosoma congolense* in goats to single and double treatment with Diminazene aceturate. *Res. in Vet. Sci.*, 53: 98-105.
- Socharmi Soedibjo., Haryanto Husein, Mochamad Lazuardi., 2003, Pemeriksaan Histologi Organ Dalam kambing Pasca Kematian Akibat Infeksi Tripanosoma evansi isolat Bangkalan. *Medika Eksakta*, 4(1): 1-6.
- The Program Against African Trypanosomiasis, 1996, *The Program Against African Trypanosomiasis (PAAT) Second Programme Committee* : Meeting Report, 4-5 December 1996. Rome, Italy.
- FAO of United Nation, Inter – Africa Bureau for Animal Resources of the Organisation for Africa Unity, International Atomic Energy Agency of the United Nation., University of Glasgow, Glasgow G61 1QH, Scotland.
- World Health Organization, 1992, *Metodologi Penelitian Kesehatan (Penuntun Latihan Metode Penelitian)*. Cetakan 1999. Pusat Penelitian Penyakit Tidak Menular, DEPKES RI, 83-159.