

Gambaran Patologi Infeksi *Trypanosoma evansi* pada Mencit Pascapengobatan dengan Ekstrak Ethanol Daun Kipahit (*Tithonia diversifolia*)

*(PATHOLOGIC FEATURES OF TRYPANOSOMA EVANSI INFECTION
AFTER BEING TREATED WITH ETHANOLIC EXTRACT
OF KIPAHIT LEAVES (TITHONIA DIVERSIFOLIA)*

**Sutiastuti Wahyuwardani¹, April H Wardhana²,
Didik T Subekti², Dharwin Siswantoro³**

¹Laboratorium Patologi, ²Laboratorium Parasitologi,
Balai Besar Penelitian Veteriner, Bogor

³Politeknik Jurusan Peternakan, Jember.

Jln RE Martadinata 30 PO Box 151, Bogor, Jawa Barat, Indonesia 16114.

Telp 0251-8331048, Fax 0251-8336425, email: sutiastutiw@yahoo.co.id

ABSTRAK

Trypanosoma evansi merupakan penyebab penyakit Surra yang dapat mengakibatkan kematian pada hewan yang terinfeksi. Pengobatan penyakit Surra dengan obat komersial memerlukan biaya yang mahal sehingga perlu dicari alternatif pengganti dengan menggunakan obat herbal. Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui gambaran patologi infeksi *T. evansi* isolat lokal asal Pemalang serta pengobatan dengan ekstrak etanol daun kipahit (*Tithonia diversifolia*). Sebanyak empat puluh dua ekor mencit jantan strain DDY dengan bobot badan 25-30 g digunakan dalam penelitian ini yang dibagi menjadi tujuh kelompok perlakuan. Masing-masing perlakuan menggunakan enam ekor mencit sebagai ulangan, yaitu: Kelompok tanpa perlakuan (P0) kontrol negatif, Kelompok kontrol positif (P1) diinfeksi *T. evansi* kedalam rongga peritoneal dengan dosis $10^4/0,3$ mL; Kelompok yang diobati dengan herbal dengan dosis 25 mg/kgBB (P2); Kelompok yang diinfeksi dan kemudian diobati dengan herbal dosis 25 mg/kgBB pada hari yang sama dan diobati lagi pada enam hari pi, ketika puncak parasitemia (P3); Kelompok yang diinfeksi dan diobati dengan herbal dosis 25 mg/kgBB pada hari yang sama (P4). Kelompok yang diinfeksi dan diobati dengan obat komersial (P5). Kelompok yang diinfeksi dan diobati dua kali dengan obat komersial (P6). Hasil penelitian menunjukkan bahwa infeksi *T. evansi* menyebabkan perubahan patologi anatomi seperti splenomegali, hepatomegali, dan keputihan pada ginjal. Lesi histopatologi seperti edema, pendarahan, infiltrasi sel radang ditemukan di organ hati, ginjal, paru-paru, jantung, dan limpa, serta edema dan vaskulitis ditemukan di otak. Parasit *T. evansi* tidak ditemukan pada organ dari salah satu mencit yang diinfeksi dan diobati dengan herbal dengan pengobatan ganda (P3). Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa pengobatan infeksi *Trypanosoma* menggunakan ekstrak etanol kipahit 25 mg/BW dapat mengurangi jumlah *T. evansi* dalam sirkulasi darah, namun tidak dapat mencegah dan menyembuhkan lesi patologis pada organ mencit yang diinfeksi.

Kata-kata kunci: patologi; *Trypanosoma evansi*; kipahit; obat herbal

ABSTRACT

Trypanosoma evansi is a causative agent of Surra disease, which can cause death on infected animals. Surra disease treatment using commercial drugs are expensive, so that it is necessary to look for an alternative drug based on herbal medicine. The present study was carried out to investigate the pathological ~~description~~ feature in of infected mice after being treated with ethanolic extract of kipahit leaves (*Tithonia diversifolia*). Forty two male mice weighted 25-30 g of DDY strain were used and divided into seven groups. Each group consisted of six mice as replication i.e. uninfected mice as a negative control (P 0), mice infected $10^4/0.3$ mL *T. evansi* intra peritoneally as a positive control (P 1), uninfected mice treated orally by ethanol extract of kipahit 25 mg/kg BW(P2), infected mice treated orally by ethanol extract of kipahit 25 mg/kg BW then gave booster (P2) on day 6 post infection – double doses (P3), infected mice treated orally by ethanol

extract of kipahit 25 mg/kg BW – single dose (P4), infected mice treated by commercial drug – single dose (P5) and infected mice treated by commercial drug – double doses (P6). Anatomy pathological lesions such as splenomegaly, hepatomegaly and pailness of kidney could be identified in mice organs. The histopathological lesions such as edema, hemorrhage, infiltration of inflammatory cells and trypanosome parasites in blood vessels could found in liver, kidney, lung, cardiac, spleen tissues of mice, edema also vasculitis found in cerebrum. It was concluded that intraperitoneal administration kipahit ethanol extract at dose 25 mg/BW might potentially reduce the number of *T. evansi* in the bloodstream of infected animals, but could not prevent and recover from *T. evansi* inducing organs damage.

Keywords: pathology; *Trypanosoma evansi*; kipahit; herbal medicine

PENDAHULUAN

Penyakit Surra merupakan penyakit pada hewan yang disebabkan oleh infeksi protozoa, yaitu *Trypanosoma evansi* yang dapat ditularkan oleh lalat penghisap darah. Hewan yang rentan terhadap penyakit ini adalah: unta, kuda, kerbau, sapi (Parsani *et al.*, 2006; Rodrigues *et al.*, 2009; OIE, 2010; Elhaig *et al.*, 2013) bahkan dilaporkan dapat menginfeksi anjing (Rjeibi *et al.*, 2015). Hampir semua mamalia reseptif meskipun tidak semuanya rentan, dan burung kemungkinan juga reseptif (Desquesnes *et al.*, 2013), bahkan ada indikasi penyakit Surra dapat menginfeksi manusia berdasarkan hasil serologi (Shagokar *et al.*, 2006). Hasil ini diperkuat oleh Powar *et al.* (2006) yang melaporkan bahwa hasil pewarnaan Giemsa ulas darah dari pasien di India menunjukkan positif mengandung *Trypanosoma*. Manusia dapat terinfeksi *T. evansi* karena kekurangan *Apolipoprotein L-I* (Vanhollebeke *et al.*, 2006).

Penyakit Surra menunjukkan gejala klinis berupa suhu tubuh meningkat dan bersifat mematikan pada hewan. Mekata *et al.* (2013) menyatakan bahwa infeksi *Trypanosoma* secara buatan pada sapi dengan *Trypanosoma* virulensi tinggi, menyebabkan demam dengan suhu tubuh 39°C, anemia, serta menurunnya jumlah leukosit dalam darah. Namun, sapi yang terinfeksi *Trypanosoma* yang virulensi rendah umumnya tidak menunjukkan gejala klinis tersebut. Kerugian ekonomi akibat penyakit surra terutama disebabkan menurunnya fertilitas, dan kematian (Dobson *et al.*, 2009), serta penghapusan ternak sakit dan impor ternak pengganti, di daerah yang berisiko tinggi (Dargantes *et al.*, 2009).

Trypanosomiasis merupakan penyakit yang bersifat endemis di beberapa daerah di Indonesia seperti Bali, Sumbawa, Jawa (Pemalang, Banten), Madura dan lain-lainnya. Wabah penyakit Surra sering terjadi di Indonesia, di antaranya dilaporkan terjadi di Provinsi Banten

yang menyebabkan beberapa ternak mati pada tahun 2014.

Sejak tahun 2013, penyakit Surra dimasukkan kembali ke daftar penyakit strategis karena setelah tahun 2007 penyakit dilaporkan menyebar dari daerah endemis ke daerah bukan endemis. Pengobatan *Trypanosomiasis* dengan obat komersial saat ini masih tergolong mahal dan sebagian besar obat-obat yang disintesis secara kimia untuk *Trypanosomiasis* pada dasarnya bersifat toksik (Ngure *et al.*, 2009), sehingga perlu dicari alternatif penggantinya.

Ekstrak herbal dilaporkan mempunyai potensi digunakan sebagai anti *Trypanosoma sp* (Habila *et al.*, 2011; Mustapha *et al.*, 2013). Kandungan obat herbal yang berpotensi sebagai antiprotozoal adalah flavonoids (Tasdemir *et al.*, 2006; Sritularak *et al.*, 2010). Flavonoid juga dilaporkan mempunyai aktivitas sebagai antiinflamasi (Bhujbal *et al.*, 2008). Adezeira *et al.* (2010) melaporkan bahwa ekstrak daun berair *K. senegalensis* menunjukkan aktivitas trypanosidal yang lemah sedangkan ekstrak kulit batang menunjukkan aktivitas yang kuat yang dipengaruhi oleh dosis yang digunakan. Namun demikian Umar *et al.* (2010) melaporkan bahwa ekstrak ethanol dari kulit batang *K. senegalensis* mempunyai aktivitas anti *T. evansi* baik secara *in-vitro* dan *in-vivo* tetapi tidak dapat mencegah terjadinya anemia yang disebabkan penyakit tersebut.

Penelitian penggunaan herbal sebagai anti *Trypanosoma* yang telah dilakukan oleh peneliti terdahulu ternyata masih belum menunjukkan hasil yang memuaskan. Sementara itu, Indonesia merupakan negara yang mempunyai keanekaragaman hayati yang melimpah, yang perlu digali potensinya untuk pengobatan infeksi *Trypanosoma sp*. Hasil penelitian sebelumnya terhadap salah satu jenis herbal yaitu kipahit menunjukkan potensinya yang mampu membunuh *Trypanosoma sp* secara *in-vitro* (data belum dipublikasi). Tujuan penelitian ini adalah untuk mengkaji gambaran patologi

akibat infeksi *Trypanosoma* dan efek pengobatan dengan ekstrak ethanol kipahit terhadap persembuhan organ hewan coba mencit dari kerusakan yang disebabkan infeksi *T. evansi*.

METODE PENELITIAN

Ekstrak Daun Kipahit

Koleksi daun kipahit diperoleh dari daerah sekitar Bandung. Sebelum digunakan sebagai obat herbal, daun kipahit dijemur hingga kering, selanjutnya diekstraksi dengan ethanol dengan perbandingan 1:10, menggunakan metode maserasi.

Isolat *T. evansi*.

Isolat *T. evansi* yang digunakan pada penelitian berasal dari Pemalang yang sebelumnya disimpan dalam bentuk *stabilate* dan direndam di dalam nitrogen cair. Sebelum digunakan, isolat *T. evansi* dihidupkan dan dimunculkan sifat patogennya kembali dengan melakukan pasase ke dalam tubuh mencit, sebanyak dua kali siklus (dua minggu).

Selanjutnya dilakukan uji *in vivo* untuk mengetahui potensi ekstrak daun kipahit sebagai anti *Trypanosoma* dan tingkat keamanannya pada hewan percobaan sesuai metode Olukunle *et al.* (2010). Hewan coba yang digunakan untuk infeksi adalah mencit *Deutch Democratic Yokohama* (DDY) yang mempunyai bobot badan 25-30 g. Penggunaan mencit sebagai hewan coba telah mendapat persetujuan etik dari Komisi Etik Pemeliharaan dan Penggunaan Hewan Coba Bbalitvet; Institusional Animal Care Unit Commitee Balai Besar Penelitian Veteriner : BBalitvet/Rd/1/2012. Sebelum digunakan semua mencit diadaptasikan selama satu minggu. Selama penelitian semua mencit diberi pakan dan minum *ad libitum*. Setelah satu minggu diadaptasikan, seluruh hewan coba ditimbang kembali dan diacak sesuai dengan kelompok perlakuan yang telah direncanakan dan dikelompokkan menjadi tujuh perlakuan, masing-masing kelompok terdiri enam ekor sebagai berikut, P0: Kontrol normal; P1: Hewan coba diinfeksi *T. evansi* tanpa perlakuan pengobatan; P2: Hewan coba diberi perlakuan pengobatan dengan ekstrak herbal; P3: Hewan coba diinfeksi *T. evansi* dan diobati dengan ekstrak herbal dengan dosis 25 mg/kg BB, kemudian diobati lagi dengan ekstrak

herbal dengan dosis yang sama – dosis ganda; P4: Hewan coba diinfeksi *T. evansi* dan diobati dengan ekstrak herbal, dengan dosis 25 mg/kg BB – dosis tunggal; P5: Hewan coba normal diobati dengan antisurra komersial; P6: Hewan coba diinfeksi *T. evansi* dan diobati antisurra komersial

Hewan coba pada kelompok P1, P2, P3, P4, P6 diinfeksi dengan *T. evansi* dosis $10^{4/0,3}$ mL secara intraperitoneal. Setelah diinfeksi, pada hari yang sama hewan coba pada kelompok P3 juga diobati dengan ekstrak herbal kipahit dosis 25 mg/kg BB per oral. Pengobatan diulang pada saat jumlah parasit mencapai puncaknya yaitu pada hari ke-6 (dosis ganda), pada kelompok P3. Hewan coba pada kelompok perlakuan P5 merupakan hewan normal yang diberi pengobatan dengan anti penyakit surra komersial dengan dosis sesuai yang direkomendasikan produsennya dan pada kelompok perlakuan P6 mencit diinfeksi *T. evansi*, dan diobati antisurra komersial.

Setelah 20 hari pascainfeksi semua hewan percobaan dikorbankan nyawanya. Organ hati, ginjal, jantung, limpa, paru-paru, dan otak dikoleksi dan direndam dalam pengawet *Buffer Normal Formalin* (BNF) 10%, kemudian diproses menjadi blok parafin. Potongan organ yang berupa blok parafin dipotong (*sectioning*) dengan ketebalan 5 μ m, kemudian dilekatkan pada gelas objek dan selanjutnya dilakukan pewarnaan rutin hematoxylin dan eosin (HE), menggunakan metode standar HE.

Selanjutnya preparat diperiksa menggunakan mikroskop cahaya dan perubahan histopatologi pada jaringan organ *diskorring* berdasarkan keparahan lesi dan luasnya lesi pada organ yang ditentukan sebagai berikut, Skor - : Jika pada pengamatan histopatologi tidak ditemukan perubahan; Skor $\pm$: perubahan yang terjadi sangat ringan dan hanya di satu lokasi; Skor + : ditemukan perubahan ringan dan tidak meluas, hanya beberapa lokasi pada organ; Skor ++ : perubahan ringan ditemukan ≥ 25 -30 % parah tapi di satu lokasi; Skor +++ : perubahan yang terjadi parah ditemukan multifokal atau ≥ 30 -50 %; Skor ++++ : perubahan parah ditemukan ≥ 50 -75%; Skor +++++ : perubahan yang terjadi ditemukan ≥ 75 %. Selanjutnya perubahan pada masing-masing organ ditabulasi dan dianalisis secara deskriptif.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Perubahan Klinis dan Patologi dan Anatomi

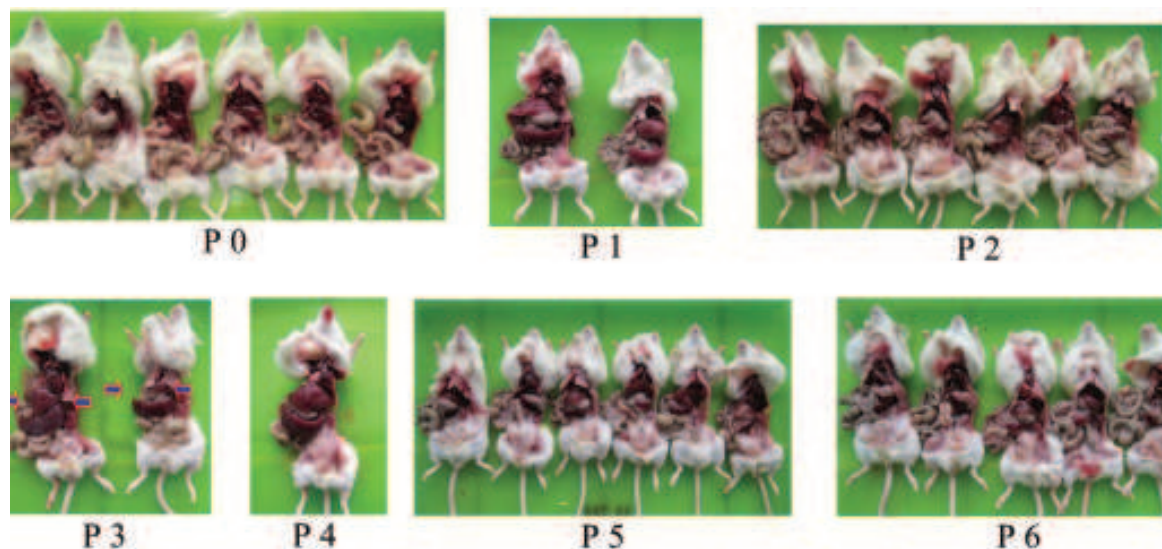
Infeksi *Trypanosoma* pada mencit percobaan menyebabkan gejala klinis yang tidak spesifik yaitu: suhu tubuh meningkat, tubuh gemetar. Pada kondisi mencit menunjukkan gejala yang nyeri atau stress yang parah dilakukan *human end point* (Noor *et al.*, 2016), untuk mengakhiri hidupnya supaya tidak menderita berkepanjangan dengan cara dislokasi *os cervicalis*. Mencit tersisa satu ekor pada kelompok yang diinfeksi dengan *T. evansi* dan pada kelompok P4 yang diinfeksi dan diobati satu kali dengan obat herbal, sedangkan pada kelompok P3 tersisa dua ekor mencit yang masih hidup.

Hasil pemeriksaan patologi anatomi ditemukan lesi yang spesifik akibat infeksi *T. evansi*, yaitu mukosa anemis yang terlihat pada mencit di kelompok P0, kelompok P2, dan kelompok P6, sebagai akibat rendahnya kadar *Pack Cell Volume/PCV* (data belum dipublikasi) dalam darah mencit. Salah satu mekanisme anemia adalah hidrolisis asam sialat oleh sialidase pada permukaan eritrosit yang menyebabkan eritrosit lisis dan mengekspos residu galaktosil. Residu ini kemudian dikenali oleh *D-galaktosa Lektin* yang spesifik pada makrofag yang menyebabkan eritrofagositosis (Sallau *et al.*, 2008). Habila *et al.* (2012) menyatakan bahwa stres oksidatif pada infeksi

T. evansi terjadi saat eritrosit menghasilkan *Reactive Oxygen Species* (ROS) yang meningkatkan peroksidasi lipid. Peroksidasi lipid dari eritrosit menyebabkan cedera membran, kerapuhan osmotik, dan kerusakan eritrosit atau sel darah merah yang menyebabkan anemia.

Perubahan lain yang ditemukan adalah pembesaran organ hati (*hepatomegaly*) dan limpa (*spleenomegaly*) pada kelompok P1, kelompok P3 dan kelompok P5 yang diinfeksi *T. evansi* tetapi tidak diobati, dengan pembesaran mencapai enam kali lipat limpa mencit yang normal (Gambar 1). Pembengkakan limpa juga dilaporkan oleh Bal *et al.* (2012), pada mencit albino yang diinfeksi *Trypanosoma sp.* Selain itu juga dilaporkan terjadi sedikit pembengkakan pada organ hati dan perdarahan ptechie. Pembengkakan pada limpa disebabkan terjadinya peningkatan aktivitas sistem fagositosis oleh sel mononuklear yang disebabkan rusaknya sel darah merah oleh *Trypanosoma sp* (Bal *et al.*, 2012). Organ limpa agak membengkak dan organ hati berwarna pucat pada seekor mencit dari kelompok perlakuan tanpa infeksi yang diberi obat herbal (P2). Hal ini kemungkinan telah terjadi infeksi alam yang tidak dapat dikontrol.

Perubahan patologi anatomi *hepatomegaly* dan *spleenomegaly* juga ditemukan pada infeksi *T. brucei*. Infeksi *Trypanosoma sp* dengan virulensi tinggi menyebabkan *splenomegaly* pada mencit, delapan hari pascainfeksi (Mekata



Gambar 1. Gambaran patologi anatomi infeksi *Trypanosoma evansi* menunjukkan hepatomegali dan splenomegali pada P1; Pengobatan dengan obat herbal dengan dosis ganda (P3) dan dosis tunggal (P4).

et al., 2013). *Hepatomegaly* dan *splenomegaly* disebabkan oleh aktivasi dan perluasan sistem *retikuloendotelial* selama infeksi *Trypanosoma sp* (Ibrahim *et al.*, 2010).

Perubahan Histopatologi

Perubahan histopatologi ditemukan pada organ jantung, hati, ginjal, paru-paru limpa

dan otak. Hasil pengamatan histopatologi menunjukkan beberapa perubahan patologi pada organ jantung, hati, ginjal, paru-paru dan limpa pada kelompok yang diinfeksi baik yang diberi obat herbal, maupun yang tidak diberi obat herbal. Sebaliknya perubahan histopatologi tersebut tidak ditemukan pada kelompok yang diobati dengan obat komersial.

Tabel 1. Histopatologi organ hati mencit yang diinfeksi *Trypanosoma evansi* dan mendapat perlakuan pengobatan ekstrak herbal kipahit.

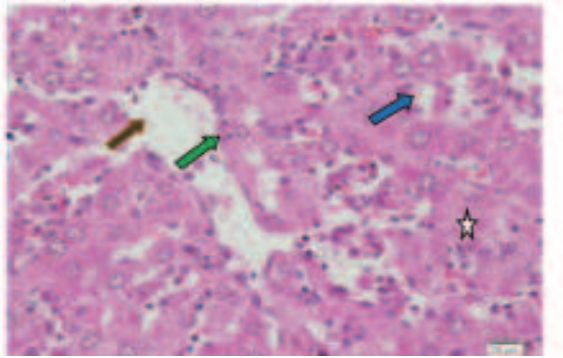
No.	Lesi	Kelompok perlakuan						
		P0	P1	P2	P3	P4	P5	P6
1.	Edema	-	++	-	+	+	-	-
2.	Pendarahan	-	+++	-	+	+	-	-
3.	Degenerasi lemak	-	++	-	+	+	-	-
4.	Nekrosis	-	+++	-	+	+	-	++
5.	Infiltrasi sel-sel radang di dalam sinusoid	+	+++	+	+	++	+	+
6.	<i>Trypanosoma</i> di dalam pembuluh darah	-	+++	-	+/-	+	-	-

Keterangan: P0= kontrol; P1= hewan coba diinfeksi *T. evansi* tanpa pengobatan; P2= hewan coba diberi pengobatan ekstrak herbal; P3= hewan coba diinfeksi *T. evansi* dan diobati ekstrak herbal (25 mg/kg BB, kemudian diulang/dosis ganda; P4= hewan coba diinfeksi *T. evansi* dan diobati ekstrak herbal, dengan dosis tunggal 25 mg/kgBB; P5= hewan normal diobati antiserum komersial; P6= hewancoba diinfeksi *T. evansi* dan diobati antiserum komersial. Skor - : tidak ditemukan perubahan patologi; Skor ± : perubahan sangat ringan dan hanya satu lokasi; Skor + : perubahan ringan dan tidak meluas, hanya beberapa lokasi pada organ; Skor ++ : perubahan ringan ditemukan meluas sekitar 25-30 % parah tapi di satu lokasi; Skor +++ : perubahan yang terjadi parah ditemukan multifokal atau meluas sekitar 30-50 %

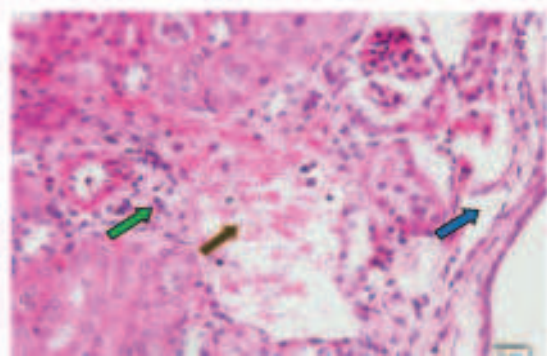
Table 2. Histopatologi organ ginjal mencit yang diinfeksi *Trypanosoma evansi* dan mendapat perlakuan pengobatan ekstrak herbal kipahit.

No.	Lesi	Kelompok perlakuan						
		P0	P1	P2	P3	P4	P5	P6
1.	Pendarahan	-	+	-	+	+	-	-
2.	Degenerasi dinding tubulus	-	+	-	+	+	-	-
3.	Hipertrofi glomerulus	+	++	-	+	+	±	-
4.	Infiltrasi sel-sel radang di daerah interstisial	+	++	-	+	+	±	-
5.	<i>Trypanosoma sp</i> ditemukan di dalam pembuluh darah	-	+	-	+/-	+	-	-

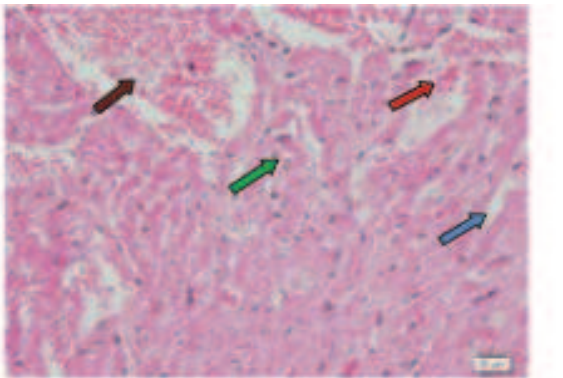
Keterangan: P0= kontrol; P1= hewan coba diinfeksi *T. evansi* tanpa pengobatan; P2= hewan coba diberi pengobatan ekstrak herbal; P3= hewan coba diinfeksi *T. evansi* dan diobati ekstrak herbal (25 mg/kg BB, kemudian diulang/dosis ganda; P4= hewan coba diinfeksi *T. evansi* dan diobati ekstrak herbal, dengan dosis tunggal 25 mg/kgBB; P5= hewan normal diobati antiserum komersial; P6= hewancoba diinfeksi *T. evansi* dan diobati antiserum komersial. Skor - : tidak ditemukan perubahan patologi; Skor ± : perubahan sangat ringan dan hanya satu lokasi; Skor + : perubahan ringan dan tidak meluas, hanya beberapa lokasi pada organ; Skor ++ : perubahan ringan ditemukan meluas sekitar 25-30 % parah tapi di satu lokasi



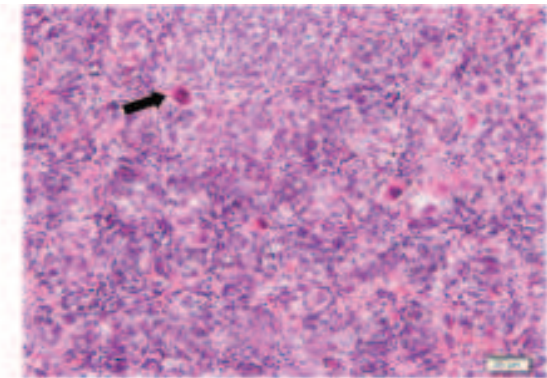
Gambar 2. Hati organ mencit dari kelompok perlakuan P3 menunjukkan, edema inrestisial (panah biru) Pendarahan (kepala panah), infiltrasi sel limfosit di sekitar pembuluh darah panah hijau), nekrosis sel hepatosit (bintang) serta ditemukan *Trypanosoma* dalam pembuluh darah (panah coklat) (HE, 400x)



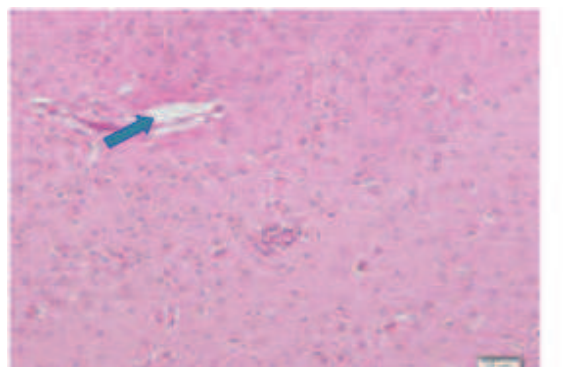
Gambar 3. Edema (panah biru), infiltrasi sel radang limfosit, makrofag di sekitar pembuluh darah arteri dan dibagian vena ginjal mencit (panah hijau), serta ditemukan *Trypanosoma* (panah coklat) pada pembuluh darah mencit dari kelompok perlakuan P4 (He, 400x)



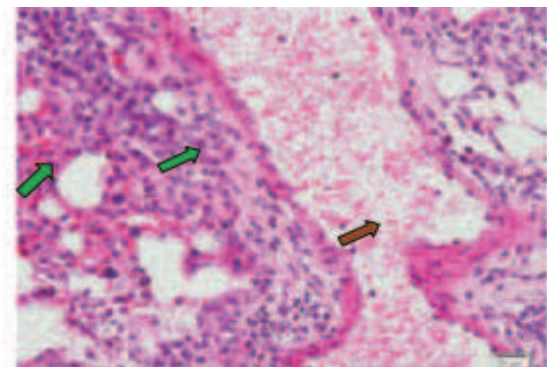
Gambar 4. Organ jantung mencit dari perlakuan P3 menunjukkan edema (panah biru), perdarahan (panah merah), infiltrasi sel limfosit (panah hijau) dan *Trypanosoma* (panah coklat) ditemukan dalam pembuluh darah (HE, 400x)



Gambar 5. Proliferasi sel raksasa (panah hitam) di limpa mencit pada kelompok perlakuan P3 (HE. 400x)



Gambar 6. Edema perivascular (panah biru) (HE, 400x)



Gambar 7. Inflamasi dan infiltrasi sel disekitar bronkheolus (panah hijau), dan disekitar dinding alveol menyebabkan penebalan dinding alveol paru-paru, *Trypanosoma* (panah coklat) pada mencit kelompok perlakuan P4 (HE, 400x)

Table 3. Histopatologi organ jantung mencit yang diinfeksi *Trypanosoma evansi* dan mendapat perlakuan pengobatan ekstrak herbal kipahit.

No.	Lesi	Kelompok perlakuan						
		P0	P1	P2	P3	P4	P5	P6
1.	Edema	-	+	-	-	-	-	-
2.	Pendarahan				+	+	-	-
3.	Infiltrasi sel radang di miokardium	-	++	-	++	++	-	-
4.	Degenerasi hingga nekrosis miokardium	-	++	-	+	+	-	-
5.	<i>Trypanosoma sp</i> di dalam pembuluh darah	-	+	-	+/-	-	-	-

Keterangan: P0= kontrol; P1= hewan coba diinfeksi *T. evansi* tanpa pengobatan; P2= hewan coba diberi pengobatan ekstrak herbal; P3= hewan coba diinfeksi *T. evansi* dan diobati ekstrak herbal (25 mg/kg BB, kemudian diulang/dosis ganda; P4= hewan coba diinfeksi *T. evansi* dan diobati ekstrak herbal, dengan dosis tunggal 25 mg/kgBB; P5= hewan normal diobati antiserum komersial; P6= hewancoba diinfeksi *T. evansi* dan diobati antiserum komersial. Skor - : tidak ditemukan perubahan patologi; Skor ± :perubahan sangat ringan dan hanya satu lokasi; Skor + : perubahan ringan dan tidak meluas, hanya beberapa lokasi pada organ; Skor ++ : perubahan ringan ditemukan meluas sekitar 25-30 % parah tapi di satu lokasi

Table 4. Histopatologi organ limpa mencit yang diinfeksi *Trypanosoma evansi* dan mendapat perlakuan pengobatan ekstrak herbal kipahit.

No.	Lesi	Kelompok perlakuan						
		P0	P1	P2	P3	P4	P5	P6
1.	Edema	-	+	-	+	-	-	-
2.	Deplesi sel limfoid	-	++	-	+	++	-	-
3.	Proliferasi sel megakariosit	-	++	-	+	-	-	-
4.	Hiperplasi pulpa putih	+	+++	-	++	++	-	-
5.	Proliferasi sel makrofag	+	+++	+	++	++	-	-

Keterangan: P0= kontrol; P1= hewan coba diinfeksi *T. evansi* tanpa pengobatan; P2= hewan coba diberi pengobatan ekstrak herbal; P3= hewan coba diinfeksi *T. evansi* dan diobati ekstrak herbal (25 mg/kg BB, kemudian diulang/dosis ganda; P4= hewan coba diinfeksi *T. evansi* dan diobati ekstrak herbal, dengan dosis tunggal 25 mg/kgBB; P5= hewan normal diobati antiserum komersial; P6= hewancoba diinfeksi *T. evansi* dan diobati antiserum komersial. Skor - : tidak ditemukan perubahan patologi; Skor ± :perubahan sangat ringan dan hanya satu lokasi; Skor + : perubahan ringan dan tidak meluas, hanya beberapa lokasi pada organ; Skor ++ : perubahan ringan ditemukan meluas sekitar 25-30 % parah tapi di satu lokasi; Skor +++ : perubahan yang terjadi parah ditemukan multifokal atau meluas sekitar 30-50 %

Organ Hati

Hasil pengamatan histopatologi pada organ hati ditemukan perubahan berupa dilatasi sinusoid dan infiltrasi eritrosit di dalam sinusoid, menunjukkan bahwa telah terjadi edema dan perdarahan yang parah, pada kelompok yang diinfeksi *Trypanosoma*, yang tidak diobati

dengan obat komersial (P1) (Tabel 1). Fokus-fokus peradangan terlihat di sekitar pembuluh darah (*vasculitis*) sesuai hasil Tantawet *et al.* (2011). Selain itu juga ditemukan vakuolisasi pada sel hati yang menunjukkan telah terjadi degenerasi lemak dan nekrosis sel hepatosit. Selain itu juga ditemukan parasit *Trypanosoma*

Table 5. Histopatologi organ otak mencit yang diinfeksi *Trypanosoma evansi* dan mendapat perlakuan pengobatan ekstrak herbal kipahit.

No.	Lesi	Kelompok perlakuan						
		P0	P1	P2	P3	P4	P5	P6
1.	Edema perivascular	-	+	-	-	-	-	-
2.	Pendarahan	-	+	-	-	-	-	-
3.	Degenerasi sel Purkinje	-	+	-	-	-	-	-

Keterangan: P0= kontrol; P1= hewan coba diinfeksi *T. evansi* tanpa pengobatan; P2= hewan coba diberi pengobatan ekstrak herbal; P3= hewan coba diinfeksi *T. evansi* dan diobati ekstrak herbal (25 mg/kg BB, kemudian diulang/dosis ganda; P4= hewan coba diinfeksi *T. evansi* dan diobati ekstrak herbal, dengan dosis tunggal 25 mg/kgBB; P5= hewan normal diobati antisyris komersial; P6= hewancoba diinfeksi *T. evansi* dan diobati antisyris komersial. Skor - : tidak ditemukan perubahan patologi; Skor ± : perubahan sangat ringan dan hanya satu lokasi; Skor + : perubahan ringan dan tidak meluas, hanya beberapa lokasi pada organ

Table 6. Histopatologi organ paru-paru mencit yang diinfeksi *Trypanosoma evansi* dan mendapat perlakuan pengobatan ekstrak herbal kipahit.

No.	Lesi	Kelompok Perlakuan						
		P0	P1	P2	P3	P4	P5	P6
1.	Edema di daerah interstisial	-	++	-	±	++	-	-
2.	Pendarahan	-	++	-	+	-	-	-
3.	Inflamasi bronkhialus	-	++	-	+	++	-	-
4.	infiltrasi sel limfosit, makrofag di dalam dinding alveol	-	++	-	+	++	-	-
5.	<i>Trypanosoma sp</i> ditemukan dalam pembuluh darah	-	++	-	+/-	+	-	-

Keterangan: P0= kontrol; P1= hewan coba diinfeksi *T. evansi* tanpa pengobatan; P2= hewan coba diberi pengobatan ekstrak herbal; P3= hewan coba diinfeksi *T. evansi* dan diobati ekstrak herbal (25 mg/kg BB, kemudian diulang/dosis ganda; P4= hewan coba diinfeksi *T. evansi* dan diobati ekstrak herbal, dengan dosis tunggal 25 mg/kgBB; P5= hewan normal diobati antisyris komersial; P6= hewancoba diinfeksi *T. evansi* dan diobati antisyris komersial. Skor - : tidak ditemukan perubahan patologi; Skor ± : perubahan sangat ringan dan hanya satu lokasi; Skor + : perubahan ringan dan tidak meluas, hanya beberapa lokasi pada organ; Skor ++ : perubahan ringan ditemukan meluas sekitar 25-30 % parah tapi di satu lokasi

sp di dalam pembuluh darah pada organ hati (Tabel 1). Perubahan tersebut juga ditemukan pada kelompok mencit yang diinfeksi *Trypanosoma sp* dan diobati dengan obat herbal dengan tingkat kerusakan yang lebih ringan. Perubahan histopatologi seperti degenerasi, nekrosis sel hepatosit serta reaksi peradangan juga ditemukan pada kelinci yang diinfeksi *T. evansi* (Alsaffar *et al.*, 2007). Selain pada kelinci dan mencit, perubahan pada hati juga dilaporkan pada tikus *bandicoot* (Biswas *et al.*,

2001). Perubahan histopatologi yang paling menonjol pada organ hati tikus berupa *pseudo-lobule formation*, nekrosis dan pendarahan di dalam sinusoid disertai degenerasi lemak.

Perubahan histopatologi berupa nekrosis pada mencit kelompok P6 dan infiltrasi sel-sel radang di dalam sinusoid ditemukan pada kelompok P5 dan P6 yang diobati dengan obat komersial. Lesi ini kemungkinan akibat adanya infeksi secara alami dengan penyebab yang tidak diketahui.

Organ Ginjal

Perubahan histopatologi ditemukan pada ginjal mencit baik dari kelompok yang diinfeksi dan tidak diobati (P1) maupun dari kelompok yang diinfeksi kemudian diobati dengan ekstrak herbal (P3 dan P4) (Tabel 2). Sebagian besar epitel tubulus menunjukkan adanya perubahan berupa: perdarahan pada ruang interlobuler ginjal. Pada ruang interstisial dan di dalam pembuluh darah ditemukan banyak *Trypanosoma sp.* Vakuolisasi pada epitel dinding tubulus proksimalis, menunjukkan adanya degenerasi lemak. Infiltrasi sel limfosit dan makrofag di sekitar pembuluh darah dan glomerulus yang mengakibatkan glomerulus hipertrofi, menunjukkan bahwa telah terjadi reaksi peradangan. Perubahan yang sama ditemukan pada mencit strain albino yang diinfeksi *T. evansi*. Hal ini menunjukkan bahwa *T. evansi* patogen bagi mencit (Bal *et al.*, 2012).

Organ Jantung

Organ jantung mencit dari kelompok yang diinfeksi *Trypanosoma sp* menunjukkan perubahan berupa edema yang sejalan dengan hasil penelitian pada mencit albino yang diinfeksi *T. evansi* (Bal *et al.*, 2012). Selain itu juga ditemukan pendarahan, infiltrasi sel mononuklear di miokardium serta degenerasi miokardium dari yang ringan hingga yang parah. *Trypanosoma* ditemukan di dalam pembuluh darah (Tabel 3 dan Gambar 3). Perubahan histopatologi masih ditemukan pada semua mencit dari kelompok yang diobati dengan ekstrak herbal (P3 dan P4). Sebaliknya perubahan histopatologi tidak ditemukan pada kelompok yang diobati dengan obat komersial, demikian juga tidak ditemukan *Trypanosoma* pada pembuluh darah dan jaringan organ jantung.

Histopatologi Organ Limpa

Organ limpa kelompok mencit yang diinfeksi *Trypanosoma* tanpa diberi pengobatan herbal maupun obat komersial menunjukkan perubahan berupa perdarahan yang meluas pada pulpa merah ditandai dengan banyaknya eritrosit dan ditemukan infiltrasi haemosiderin (hemosiderosis) (Tabel 4). Selain itu juga banyak ditemukan sel raksasa yang merupakan agregasi dari histiosit yang membentuk *multinuclear giant sel*. Depleksi sel limfoid yang disebabkan nekrosis sel limfoid terlihat pada limpa ditandai dengan banyaknya *sky star* di bagian tengah pulpa putih. Proliferasi *giant cell* dapat ditemukan pada pulpa putih dan pulpa

merah. Hasil ini sesuai yang dilaporkan oleh Tantawet *et al.* (2011) bahwa infeksi *T. evansi* pada mencit menyebabkan lesi nekrosis, dan ditemukan sel megakariosit di pulpa merah atau pulpa putih, jaringan ikat dan reruntuhan sel. Demikian juga Bal *et al.* (2012) melaporkan bahwa agregasi sel histiosit membentuk *giant cell* ditemukan pada limpa mencit albino yang diinfeksi *Trypanosoma sp.*

Histopatologi Organ Otak

Pada *cerebellum* mencit kelompok diinfeksi *Trypanosoma sp* ditemukan perubahan berupa meluasnya ruang *Virchow Robin* yang menunjukkan adanya edema *vascular* (Chamond *et al.*, 2010), (Tabel 5 dan Gambar 5). Infiltrasi sel radang ditemukan di sekitar pembuluh darah (*vascular*) menandakan adanya *vasculitis*. Selain itu juga ditemukan inti sel Purkinje yang mengalami nekrosis. Menurut Bal *et al.* (2012), perubahan ini kemungkinan disebabkan adanya substansi yang bersifat toksik yang dilepas oleh parasit. *Trypanosoma sp* ditemukan pada pembuluh darah otak. Menurut Biswas (2010), infiltrasi limfosit dan sel-sel plasma; pembendungan, perivaskular *cuffing*, gliosis dan lesi otak terlihat pada 12-14 hari pascainfeksi. *Multiple sclerosis*, *neuronophagia*, perdarahan fokal, hiperplasia otak, *oligodendrocytoma*, *astrocytoma* dan degenerasi lemak jaringan otak juga ditemukan. Selain itu ditemukan edema yang meluas dalam sel *ependymal*, *choroid plexus*, infiltrasi sel radang, dan pecahnya lapisan ventrikel *ependymal*. Parasit *Trypanosoma sp* ditemukan baik dalam jaringan otak dan *choroid plexus*.

Organ Paru-paru

Pada kelompok hewan coba yang diinfeksi *T. evansi* yang tidak diobati (P1) maupun yang diobati dengan obat herbal (P3 dan P4) ditemukan perubahan berupa akumulasi cairan eksudat yang bercampur darah di dalam alveoli (Tabel 6 dan Gambar 6). Dinding alveoli mengalami penebalan, karena diinfiltrasi sel-sel radang mononuklear dan sel eritrosit. Penebalan dinding alveoli disebabkan edema dan *hypercellularity* sering ditemukan, bisa mencapai 10 kali lipat tebal dinding alveoli yang normal. *Hypercellularity* dapat disebabkan oleh proliferasi pneumosit tipe II dan makrofag (Melnicov *et al.*, 2005). Infiltrasi sel mononuklear juga banyak ditemukan di sekitar pembuluh darah. Pada pembuluh darah banyak ditemukan *T. evansi*. Pembendungan dan edema pada alveoli disebabkan adanya respons

peradangan paru-paru terhadap adanya infeksi parasit yang menyebabkan vasodilatasi dan eksudasi. Perubahan ini juga dilaporkan oleh Biswas *et al.* (2010) pada tikus yang diinfeksi dengan *Trypanosoma sp.* Sebaliknya perubahan tersebut tidak ditemukan pada kelinci yang diinfeksi *Trypanosoma sp.* Peradangan bronkhus dan kongesti pada bronkiolus ditemukan pada kelompok (P1, P3, dan P4), yang ditandai dengan adanya infiltrasi limfosit, makrofag dan eritrosit pada dinding bronkhus dan bronkiolus. Perubahan yang ditemukan pada kelompok P4 lebih parah dari pada kelompok P3, menunjukkan bahwa pengobatan dosis ganda lebih efektif dibandingkan dosis tunggal meskipun tidak dapat mencegah kerusakan organ secara total.

SIMPULAN

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa infeksi *Trypanosoma* pada mencit menyebabkan lesi pada organ otak, jantung, paru-paru, ginjal, hati dan limpa dan ditemukan *Trypanosoma sp* pada organ-organ tersebut. Pemberian ekstrak *T. diversifolia* sebagai obat herbal per oral dengan dosis ganda mengurangi jumlah *Trypanosoma sp* pada pembuluh darah di berbagai organ mencit, namun tidak dapat mencegah kerusakan pada organ mencit.

SARAN

Penelitian ini dapat dilanjutkan dengan menggunakan isolat *T. evansi* yang memiliki patogenitas yang tinggi sehingga dapat diketahui apakah potensi ekstrak kipahit ini sebagai antitrypanosoma juga mengurangi perkembangan parasit ini di dalam tubuh mencit.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Bapak Eka S Purwanto, Parlin Nefo, Edi satria, dan Yudi Mulyadi SSi, atas bantuan teknis yang diberikan. Penulis juga mengucapkan terima kasih kepada Dr. drh. Dyah Haryuningtias Savitri yang telah membantu dalam penyiapan isolat *Trypanosoma evansi*.

DAFTAR PUSTAKA

- Adeiza AA, Mohammed A, Mamman M. 2010. Comparative in vivo evaluation of the trypanocidal activities of aqueous leaf, stem-bark and root extracts of *Khaya senegalensis* on *Trypanosoma evansi*. *J of Med Plants Res* 4(17): 1770-1777.
- Alsaffar AH, Hassoon AF, Farag AH. 2007. Blood picture and hepatic changes in rabbits experimentally infected with *Trypanosoma evansi*. Iraqi strain. *Med. J of Babylon* 4(3-4): 358-364.
- Bal MS, Singla LD, Kumar H, Vasudev A, Gupta K, Juyal PD. 2012. Pathological studies on experimental *Trypanosoma evansi* infection in Swiss albino mice. *J Parasit Dis* 36(2): 260-264. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3427679/pdf/12639_2012_Article_120.pdf
- Bhujbal SS, Chitlange SC, Suralkar AA, Shinde DB, Patil MJ. 2008. Anti- inflammatory activity of an isolated flavonoid fraction from *Celosia argentea* Linn. *J Med Plants Res* 2(3): 052-054.
- Biswas D, Choudhury A, Misra KK. 2001. Histopathology of *Trypanosoma Trypanozoon evansi* infection in bandicoot rat. I. Visceral organs. *Exp Parasitol* 99(3): 148-59.
- Biswas D, Choudhury A, Misra KK. 2010. Histopathology of *Trypanosoma (Trypanozoon) evansi* Infection in Bandicoot Rat. II. Brain and Choroid Plexus. *Proc zool Soc* 63(1): 27-37. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3427679/>
- Chamond N, Cosson A, Blom-Potar MC, Jouvion G, D'Archivio S, Medina M, Droin-Bergère S, Huerre M, Goyard S, Minoprio P. 2010. *Trypanosoma vivax* infection: Pushing Ahead with mouse model for the study of Nagana. *Inter. Parasitol, Hemathological and Pathological Parameters* 4(8): 1-10. www.plosntds.org.e-792.
- Dargantes AP, Mercado RT, Dobson RJ, Reid SA. 2009. Estimating the impact of *Trypanosoma evansi* infection (surra) on buffalo population dynamics in southern Philippines using data from cross-sectional surveys. *Inter J for Parasitol* 39: 1109-1114.

- Desquesnes M, Dargantes A, Lai DH, Lun ZR, Holzmuller P and Jittapalapong S. 2013. Review Article *Trypanosoma evansi* and Surra: A Review and Perspectives on Origin, History, Distribution, Taxonomy, Morphology, Hosts, and Pathogenic Effects. *Bio Med Res Inter*: 1-22. <https://www.hindawi.com/journals/bmri/2013/194176/>
- Dobson RJ, Dargantes AP, Mercado RT, Reid SA, Dobson RJ. 2009. Models for *Trypanosoma evansi* (surra), its control and economic impact on small-hold livestock owners in the Philippines. *Inter J for Parasitol* 39: 1115-1123.
- Elhaig MM, Youssef AI, El-Gayar AK. 2013. Molecular and parasitological detection of *Trypanosoma evansi* in Camels in Ismailia, Egypt *Vet Parasitol* 198: 214-218.
- Habila N, Humphrey NC, Abel AS. 2011. Trypanocidal potentials of *Azadirachta indica* seeds against *Trypanosoma evansi*. *Vet Parasitol* 180: 173-178.
- Habila N, Inuwa MH, Aimola IA, Udeh MU, Haruna E. 2012. Pathogenic mechanisms of *Trypanosoma evansi* infections. *Research in Vet Sci* 93: 13-17.
- Ibrahim MA, Aliyu AB, Sallau AB, Bashir M, Yunusa I, dan Umar TS. 2010. *Senna occidentalis* leaf extract possesses antitrypanosomal activity and ameliorates the trypanosome-induced anemia and organ damage. *Pharmacognosy Res*. 2(3): 175-180. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3141310/>
- Mekata H, Abes NS, Gutierrez CA, Dargantes AP, Witola WH, Inoue N, Onuma M, Murata S, Ohashi K. 2013. Isolation, cloning, and pathologic analysis of *Trypanosoma evansi* field isolates <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3957988/pdf/zii1074.pdf>
- Melnikov VG, Velasco FF, Gomez FE, Rodriguez FG, Dobrovinskaya OR. 2005. Pathologic changes in lungs caused by Mexican isolates of *Trypanosoma cruzi* in acute phase of infection in mice. *Am J Trop Med Hyg* 73(2): 301-306
- Mustapha L, Angela O, David MY. 2013. Anti-trypanosoma Activity of the Ethanolic Leaf Extract of *Senna occidentalis* (Fabaceae) on *Trypanosoma brucei brucei* Infected Mice. *International Journal of Basic and Applied Sciences* 2(1): 32-37.
- Noor MN, Dharmayanti NLPI, Wahyuwardani S, Cahyaningsih T, Widianingrum Y, Sukmasari PK, Syawal M, Febritrinasiana A, Miniswaty A, Tiesnamurti B. 2016. Penggunaan dan Penanganan Hewan Coba Rodensia dalam penelitian sesuai dengan kesejahteraan hewan. Pusat Penelitian dan Pengembangan Peternakan.
- Ngure RM, Onger B, Karori SM, Wachira W, Maathai RG, Kibugu JK, Wachira FN. 2009. Anti-trypanosomal effect of *Azadirachta indica* (neem) extract on *Trypanosoma brucei* rhodesiense-infected mice. *Eastern Journal of Medicine* 14: 2-9.
- OIE. 2010. *Trypanosoma Evansi* Infection (Surra). Terrestrial Manual:1-14 http://web.oie.int/eng/normes/MMANUAL/2008/pdf/2.01.17_TRYPANO.pdf
- Olukunle JO, Abatan MO, Soniran OT, Takeet M, Idowu OA, Akande FA, Biobaku KT and Jacobs EB. 2010. *In vivo* antitrypanosoma *T. evansi* of same medicinal plant extracts from Ogun State, Nigeria. *Scien World J* 5(1): 17-19.
- Parsani HR, Singh V, Momin RR. 2008. Common parasitic diseases of camel," *Veterinary World* 1(10): 317-318.
- Powar RM, Shegokar VR, Joshi PP, Dani VS, Tankhiwale NS, Truck P, Jannin J, Bhargava A. 2006. A rare case of human Trypanosomiasis caused by *Trypanosoma evansi*. *Indian J of Med Microbiol* 1: 72-74.
- Rjeibi MR, Hamida TB, Dalgatova Z, Mahjoub T, Rejeb A, Dridi W, Gharbi M. 2015. First report of surra (*Trypanosoma evansi* infection) in a Tunisian dog. www.parasite-journal.org. *Parasite* 22(3): 1-4.
- Rodrigues A, Figuera RA, Souza TM, Schild AL, Barros CS. 2009. Neuropathology of Naturally Occurring *Trypanosoma evansi* Infection of Horses. *Vet Pathol* 46 (2): 251-258.
- Shegokar VR, Powar RM, Joshi PP, Bhargava A, Dani VS, Katti R, Zare VR, Khanande ID, Jannin J, and Truc P. 2006. Human Trypanosomiasis caused by *Trypanosoma evansi* in a village in India: Preliminary serologic survey of the local population. *Am J Trop Med Hyg*, 75(5): 869-870.

- Sirtularak B, Tantituvanont A, Chanvorachote P, Meksawan K, Miyamoto T, Kohno Y, Likhitwtayawuid K. 2010. Flavonoids with free radical scavenging activity and nitric oxide inhibitory effect from the stem bark of *Artocarpus gomezianus*. *J of Med Plants Res* 4(5): 387-392.
- Tantawet S, Willemse B, Taweethavornasawat P, Kaeoket K. 2011. *Trypanosoma evansi* infection in mice and sow: cryopreservation of *T. evansi*, its infectivity and subsequent clinical signs and pathological findings. *Journal of Applied Animal Sci* 4(3): 31-37.
- Tasdemir D, Kaiser M, Brun R, Yardley V, Schimdt TJ, Tosun F, Ruedi P. 2006. Antitrypanosomal and Antileishmanial Activities of Flavonoids and Their Analogues: In Vitro, In Vivo, Structure-Activity Relationship, and Quantitative Structure-Activity Relationship Studies. *Antimicrob Agents and Chemoth* 50: 1352-1364
- Teixeira TL, Teixeira SC, da Silva CV, de Souza MA. 2014. Potential therapeutic use of herbal extracts in trypanosomiasis. *Pathogens and Global Health* 108(1):30-36. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4083165/pdf/pgh-108-01-030.pdf>
- Umar IA, Ibrahim MA, Fari NA, Isah S and Balogun DA. 2010. In-vitro and -vivo anti *Trypanosoma evansi* activities of extracts from different parts of *Khaya senegalensis*. *J of Cell and Animal Biol* 4(6): 91-95.
- Vanhollebeke, B, Truc P, Poelvoorde P, Pays A, Joshi PP, Katti R, Jannin GD, Pays E. 2006. Human *Trypanosoma evansi* Infection Linked to a Lack of Apolipoprotein L-I. *N Engl J Med* 355: 2752-2755.