

**PENGARUH PEMBERIAN VAKSINASI BCG, STRES, DAN KOMBINASI
VAKSINASI BCG – STRES TERHADAP KEMAMPUAN FAGOSITOSIS
MAKROFAG PADA
MENCIT BALB/c**

ARTIKEL PENELITIAN

Diajukan untuk memenuhi tugas dan melengkapi syarat dalam menempuh Program Pendidikan Sarjana Fakultas
Kedokteran

**Oleh
Chandra Aquino Tambunan
G2A002043**

**FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS DIPONEGORO
SEMARANG
2006**

LEMBAR PENGESAHAN

Pengaruh Pemberian Vaksinasi BCG, Stres, dan Kombinasi Vaksinasi BCG – Stres Terhadap Kemampuan Fagositosis Makrofag pada Mencit BALB/c

Yang dipersiapkan dan disusun oleh :

Chandra Aquino Tambunan
G2A002043

Telah dipertahankan di depan tim penguji Karya Tulis Ilmiah Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro Semarang pada tanggal 25 Juli 2006

Tim Penguji

**MEDICAL FACULTY
DIPONEGORO UNIVERSITY
MEDICAL ARTICLE, JULY 2006**

EFFECT ADMINISTRATION OF BCG VACCINE, STRESS, AND COMBINATION OF BCG VACCINE – STRESS TO THE MACROPHAGE PHAGOCYTES ABILITY IN BALB/C MICE.

Chandra Aquino Tambunan¹⁾, Dwi Pudjonarko²⁾

ABSTRACT

Background: Previous study proved that stress mice, macrophage phagocytosis ability was lower than control. BCG vaccination is known as an immune stimulator., and may increased it. To highlight stress effect and effort to deminish the cellular immunity impairment, this particular study is designed using mice as a model.

Objective: The objective of this study is to prove the effect of BCG vaccine, stress, and combination of BCG vaccine-stress to the macrophage phagocytes ability in BALB/c mice.

Method: Laboratory Experimental study was used Post-Test Only Control Group Design. The 24 female BALB/c mice (6-8 weeks with weight $21,52 \pm 1,71$ gram) obtained from PUSVETMA (Pusat Veterinaria Farma) Surabaya. Were divided into four groups and received standart laboratoris diet daily. The first group (control group=K group) received no other additional treatment, while the second group (BCG group) received intra-peritoneal injection of 0,1 cc BCG at day 1st and 11th. The third group Stress/Electrical Foot Shock group=EFS group) received stress with electrical foot shock at day 12th until 21st and the fourth group (Stress+BCG group=EFS+BCG group) received intra-peritoneal injection of 0,1 cc BCG at day 1st and 11th and received stress with electrical foot shock at day 12th until 21st. At the day 21st ,all groups were intravenously injected with 10^4 live *L. monocytogenes* ($LD_{50}=2 \times 10^5$ bacteria) obtained from Balai Laboratorium Kesehatan Semarang and sacrificed at day 26th. Number of procentace macrophage phagocytosis /200 cells were measured. Within group difference of data were analyzed by One-Way ANOVA. Difference between groups was analyzed by Post Hoc Test Bonferroni.

Result: There were significant differences in the number of procentace macrophage phagocytosis /200 cells between EFS group and EFS+BCG group. The number of procentace macrophage phagocytosis /200 cells in EFS group lower than EFS+BCG group.

Conclusion: It could be concluded that stress an immunosuppressive effect, while additional treatment with BCG was able to restore immune response indicated by the increased of macrophage phagocytosis ability in female BALB/c mice.

Key Words: Macrophage, Phagocytes, Stress, BCG

¹⁾ Undergraduate student, Medical Faculty, Diponegoro University, Semarang

²⁾ Lecturer, Medical Physic Department, Diponegoro University, Semarang

FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS DIPONEGORO
ARTIKEL ILMIAH, JULI 2006

PENGARUH PEMBERIAN VAKSINASI BCG, STRES, DAN KOMBINASI VAKSINASI BCG – STRES TERHADAP KEMAMPUAN FAGOSITOSIS MAKROFAG PADA MENCIT BALB/c

Chandra Aquino Tambunan¹⁾, Dwi Pudjonarko²⁾

ABSTRAK

Latar Belakang: Pada mencit yang mendapat stres, fagositosis makrofag lebih rendah dibandingkan dengan kontrol. Disisi lain ada imunostimulator yaitu BCG yang sudah biasa digunakan dan terbukti dapat meningkatkan respon imunitas seluler melalui respon tipe tersebut. Untuk melihat efek stres dan pengaruhnya pada penurunan respon imunitas seluler maka penelitian ini menggunakan mencit sebagai model penelitian.

Tujuan: Penelitian ini untuk membuktikan adanya perbedaan kemampuan fagositosis makrofag pada mencit yang diberi stres dan mendapat vaksinasi BCG dengan yang tidak mendapat vaksinasi BCG.

Metode: Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratoris dengan pendekatan the post-test only control group design. 24 ekor mencit betina BALB/c (umur 6-8 minggu dengan berat badan rerata $21,52 \pm 1,71$ gram) diperoleh dari PUSVETMA (Pusat Veterinaria Farma) Surabaya. Mencit tersebut dibagi menjadi empat kelompok dan masing-masing mendapat makanan standar setiap hari. Pada Kelompok Kontrol (kelompok

K), mencit tidak mendapatkan perlakuan, sedangkan kelompok BCG (kelompok BCG) divaksinasi secara intra peritoneal dengan 0,1cc BCG pada hari ke-1 dan ke-11. Kelompok Stres/*Electrical Foot Shock* (kelompok EFS) mendapatkan stres dengan *electrical foot shock* mulai hari ke-12 sampai hari ke-21. Dan kelompok Stres+BCG (Kelompok EFS+BCG) mendapat injeksi 0.1 cc BCG secara intraperitoneal pada hari ke-1 dan ke-11 dan stres dengan *electrical foot shock* mulai hari ke-12 sampai hari ke-21. Pada hari ke-21 semua kelompok diinjeksi 0.1cc secara intravena dengan 10^5 *Listeria monocytogenes* hidup ($LD_{50} = 2 \times 10^5$ bacteria) yang diperoleh dari Balai Laboratorium Kesehatan Semarang dan pada hari ke-26 semua mencit dibunuh untuk pemeriksaan. Selanjutnya dihitung prosentase makrofag yang memfagositosis partikel lateks dalam 200 sel. Dilakukan uji One-Way ANOVA untuk melihat adanya perbedaan pada keempat kelompok perlakuan. Besarnya perbedaan masing-masing kelompok perlakuan dianalisis lebih lanjut dengan Post Hoc Test Bonferroni.

Hasil: Penelitian mendapatkan adanya perbedaan bermakna kemampuan fagositosis makrofag pada mencit BALB/c dengan diberi stres yang divaksinasi BCG dibandingkan dengan tanpa vaksinasi BCG. Ternyata prosentase makrofag yang melakukan fagositosis partikel lateks dalam 200 makrofag lebih rendah pada kelompok mencit yang mendapat stres tanpa vaksinasi BCG dibanding yang mendapat vaksinasi BCG.

Simpulan: Didapatkan bahwa stres dapat menurunkan sistem imun, upaya penggunaan BCG dapat memperbaiki respon imunitas tersebut melalui peningkatan kemampuan fagositosis makrofag pada mencit BALB/c.

Kata Kunci: Makrofag, Fagositosis, Stres, BCG

1) Mahasiswa Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro, Semarang

2) Staf Pengajar Bagian Fisika Medik Universitas Diponegoro, Semarang

PENDAHULUAN

Stres merupakan keadaan yang sering kita jumpai dalam kehidupan sehari-hari. Stres berarti keadaan yang

merupakan akibat uji atau ancaman terhadap kapasitas adaptif kita, sesuatu yang mengganggu keseimbangan dinamik atau homeostatik tubuh kita.ⁱ Berbagai hal yang dapat menyebabkan terjadinya stres disebut sebagai

stresor.^{ii,iii,iv} Pada berbagai studi pada hewan percobaan didapatkan bahwa stresor yang diberikan dapat

menyebabkan gangguan fungsi sistem imun tubuh terutama respon imun seluler.¹ Gangguan respon imun seluler

tersebut dapat berupa penurunan kemampuan fagositosis makrofag.¹ Pada manusia stres dapat mempengaruhi

sistem pertahanan tubuh dan meningkatkan kerentanan terhadap penyakit dan infeksi.¹

Listeria Monocytogenes merupakan bakteri intraseluler yang banyak digunakan model dalam mempelajari

infeksi bakteri intra seluler. Bakteri ini dapat bertahan hidup didalam makrofag dan menghindari mekanisme

bakterisidal oleh makrofag. Pada manusia, bakteri ini menyebabkan meningo-encephalitis.^v

Berdasarkan latar belakang mengenai fagositosis makrofag, vaksin BCG diketahui dapat mengubah beberapa

komponen respon imun, mengubah beberapa tipe sel dan mendorong efek positif (stimulasi) atau efek negatif

(inhibisi) tergantung pada sistem imunitas dan bagaimana menggunakannya.^{vi} BCG termasuk jenis vaksin hidup

yang dilemahkan.^{vii,viii,ix}

BCG adalah suatu bentuk mutan dari *Mycobacterium bovis*, sebagai bakteri intrasel yang dilemahkan, di makrofag BCG digunakan untuk memacu respon imunitas seluler dan bukan humoral.^x

Penelitian ini berusaha menjawab apakah kemampuan fagositosis makrofag pada mencit yang mendapat stres dan diberi vaksinasi BCG lebih tinggi daripada yang tidak mendapat vaksinasi BCG. Dalam penelitian ini dipilih binatang coba mencit BALB/c . Tujuan penelitian ini untuk menganalisis perbedaan kemampuan fagositosis makrofag pada mencit BALB/c stres karena renjatan listrik yang mendapat vaksinasi BCG dibanding dengan yang tidak mendapat vaksinasi BCG. Menurunnya kemampuan fagositosis makrofag tersebut kemungkinan dapat diatasi dengan pemberian BCG yang mudah didapat dengan harga murah. Oleh karena penelitian ini dilakukan pada hewan coba maka hasil penelitian ini diharapkan dapat menjadi landasan penelitian lebih lanjut pada manusia.

METODE PENELITIAN

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorik, dengan pendekatan *The Post Test – Only Control Group Design* yang menggunakan binatang percobaan sebagai objek penelitian.^{xi}Percobaan dilakukan dengan rancangan acak lengkap (*Completely Randomized Design*), randomisasi sederhana dilakukan menggunakan komputer. Perlakuan adalah pemberian stres menggunakan *electric foot shock* pada mencit dan pemberian vaksinasi BCG dengan keluaran (*outcome*) adalah perubahan imunitas seluler yang dinilai dari kemampuan fagositosis makrofag.

Sampel penelitian ini adalah 24 ekor mencit yang didapat dari PUSVETMA (=Pusat Veterinaria Farma) Surabaya. Untuk menghindari bias dalam penelitian dilakukan kontrol hal-hal berikut:^{xii}faktor keturunan mencit (diambil mencit yang secara genetis sifatnya sama, yaitu mencit jenis BALB/c), umur mencit (6-8 minggu), jenis kelamin (betina), berat badan sebelum percobaan (rerata $21,52 \pm 1,71$ gram), penempatan kandang (ditempatkan pada tempat yang sama dan dikandangan secara individual), kebersihan (frekuensi dan kualitas pembersihan

dilakukan sama untuk tiap mencit), cara pemberian makanan (pada jam-jam yang sama dengan berat yang sama secara *ad libitum*), faktor kesehatan (mencit harus sehat), begitu pula dengan ventilasi dan pencahayaan diperlakukan sama.

Sebelum digunakan dalam penelitian, 24 ekor mencit diadaptasikan terlebih dahulu selama 1 minggu. Selama dalam pemeliharaan mencit diberi makan dan minum secara *ad libitum*. Untuk menghindari bias terhadap berat badan dilakukan penimbangan mencit sebelum mendapatkan perlakuan. Berat badan rerata mencit yang digunakan adalah $21,52 \pm 1,71$ gram. Langkah selanjutnya adalah menganalisis homogenitas sampel. Dari uji *Levene Statistic* didapatkan 0,091 (*p value*=0,964) sehingga disimpulkan bahwa berat badan sampel adalah homogen sehingga sampel dapat mengikuti langkah selanjutnya berupa perlakuan. Setelah menjalani masa adaptasi, mencit kemudian dibagi menjadi 4 kelompok acak, masing-masing terdiri dari 6 ekor. Semua mencit mendapatkan makanan standar laboratoris. Pada Kelompok Kontrol (K), mencit tidak mendapatkan perlakuan, sedangkan kelompok BCG (BCG) divaksinasi secara *intra peritoneal* dengan 0,1cc BCG pada hari ke-1 dan ke-11. Kelompok Stres/Electrical Foot Shock (EFS) mendapatkan stres dengan *electrical foot shock* mulai hari ke-12 sampai hari ke-21. Dan kelompok Stres+BCG (EFS+BCG) mendapat injeksi 0.1 cc BCG secara *intraperitoneal* pada hari ke-1 dan ke-11 dan stres dengan *electrical foot shock* mulai hari ke-12 sampai hari ke-21. Pada hari ke-21 semua kelompok diinjeksi 0.1cc secara *intravena* dengan 10^5 *Listeria monocytogenes* hidup ($LD_{50} = 2 \times 10^5$ bacteria) yang diperoleh dari Balai Laboratorium Kesehatan Semarang dan pada hari ke-26 semua mencit dibunuh untuk pemeriksaan sebagaimana dilakukan oleh Fritsche dkk. Semua mencit dibunuh dengan pembiusan chloroform yang dilanjutkan dengan dislokasi leher. Stres yang diberikan berupa renjatan listrik yang dilakukan dengan cara mengalirkan arus listrik pada lempeng tembaga di dasar kandang perlakuan tempat kaki mencit berpijak / *electrical foot shock*. Aliran listrik akan mengejutkan mencit. Besar arus listrik antara 1 – 3mA. Vaksin BCG buatan Bio Farma. Vaksin diberikan dengan dosis 0,1 cc secara *i.p* yang diberikan pada hari ke-1 dan diberikan booster 10 hari berikutnya (hari ke-11) dengan dosis sama. Pemilihan kuman *Listeria monocytogenes* disebabkan karena dalam eksperimen kuman ini telah banyak dijadikan model untuk mempelajari infeksi bakteri intaseluler. Bakteri ini dapat bertahan hidup di dalam makrofag dan menghindari

bakterisidal makrofag. Karena hidupnya yang intraseluler maka antibodi, komplemen dan sel granulosit tidak dapat mencapai mereka. Walaupun antibodi mungkin memainkan peranan dalam pencegahan infeksi, jelas bahwa makrofaglah yang merupakan pertahanan utama terhadap kuman ini. Mekanisme imun yang berperan melawan *Listeria monocytogenes* adalah T cell-mediated immunity. Sehingga 10^4 organisme *Listeria monocytogenes* hidup ($LD_{50}=2 \times 10^5$) dapat menginduksi respon imun seluler yang akan dipelajari dalam penelitian ini. Kunci utama mekanisme ini adalah limfosit T yang tersensitisasi dan makrofag yang teraktifasi. Di sini terlibat fungsi makrofag sebagai APC yang mengikutsertakan MHC kelas II^{xiii,xiv}

Cairan peritoneum diambil untuk mengisolasi makrofag kemudian dikultur dalam mikroplate dengan coverslip, 24 jam kemudian ditambahkan latex beads. Coverslip dikeringkan, difiksasi dengan metanol absolut dan dipulas dengan Giemsa 20% selama 30 menit kemudian dicuci. Setelah kering, coverslip dimounting pada objek glass, kemudian dilakukan pemeriksaan kemampuan fagositosis makrofag. Pemeriksaan kemampuan fagositosis makrofag dilakukan secara mikroskopis menggunakan mikroskop cahaya dengan pembesaran 400 kali dengan cara menghitung jumlah makrofag yang memfagositosis partikel lateks dalam 200 makrofag .

HASIL PENELITIAN

Jumlah prosentase makrofag yang memfagositosis partikel lateks paling rendah pada kelompok mencit yang mendapat stres yaitu sebesar $(30,58 \pm 16,87) / 200$ makrofag (tabel 1). Analisis statistik menggunakan uji One-Way ANOVA, ternyata terdapat perbedaan yang bermakna ($p \text{ value}=0,000$) pada prosentase makrofag yang memfagositosis partikel lateks antar kelompok percobaan yang terdiri dari 4 kelompok. Perbedaan lebih lanjut untuk tiap kelompok percobaan dianalisis dengan uji Bonferroni (tabel 2)^{xv,xvi,xvii,xviii,xix}

Tabel 1. Hasil penghitungan prosentase makrofag yang memfagositosis partikel lateks

Kelompok Percobaan	N	Minimum	Maksimum	Rerata	Simpang Baku
Kontrol	6	67	89,5	77,83	9,24
BCG	6	62,5	83,5	74,08	8,39
EFS	6	11,5	56,5	30,58	16,87

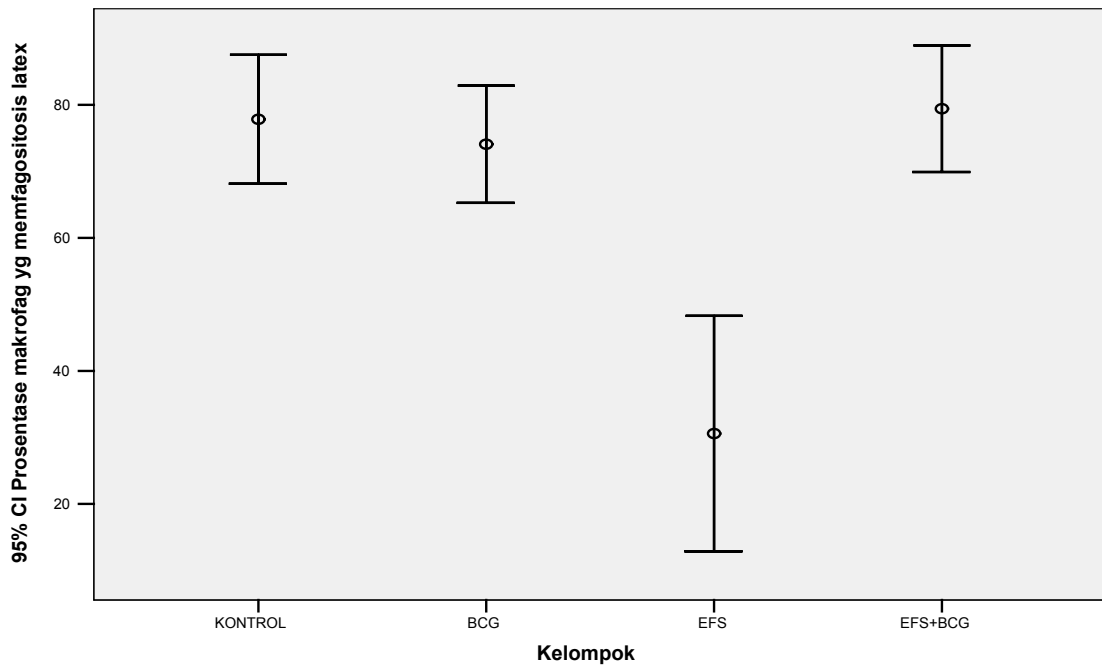
EFS+BCG	6	71	92	79,42	9,06
---------	---	----	----	-------	------

Apabila jumlah prosentase makrofag yang memfagositosis partikel lateks kelompok Stres (EFS) dibandingkan dengan Kontrol (K) maka didapatkan perbedaan yang bermakna ($p \text{ value}=0,000$) demikian juga apabila dibandingkan dengan kelompok BCG (BCG) ($p \text{ value}=0,000$) dan kelompok Stres + BCG (EFS+BCG) ($p \text{ value}=0,000$) (tabel 2).

Tabel 2. Uji Bonferroni untuk masing-masing kelompok percobaan

Post Hoc Test					
Bonferroni	Rerata	Kontrol	BCG	EFS	EFS+BCG
Kontrol	77,83	-	p=	p=0,000*	p=
BCG	74,08	p=	-	p=0,000*	p=
EFS	30,58	p=0,000*	p=0,000*	-	p=0,000*
EFS+BCG	79,42	p=	p=	p=0,000*	-
* Bermakna		One-way ANOVA		F=25,085	(p value=0,000)

Jumlah prosentase makrofag yang memfagositosis partikel lateks pada kelompok Stres + BCG (EFS+BCG) didapatkan sebesar $(79,42 \pm 9,06) / 200$ makrofag yang tidak berbeda secara bermakna apabila dibandingkan dengan kelompok BCG ($p \text{ value}=1,000$) maupun dengan kelompok Kontrol ($p \text{ value}=1,000$). Disimpulkan bahwa terdapat perbedaan bermakna antara prosentase makrofag yang memfagositosis partikel lateks pada mencit BALB/c yang diberi stres dan mendapat vaksinasi BCG dibanding yang tidak mendapat vaksinasi BCG. Prosentase makrofag yang memfagositosis partikel lateks lebih rendah pada kelompok mencit BALB/c yang diberi stres tanpa vaksinasi BCG dibanding yang mendapat vaksinasi BCG.



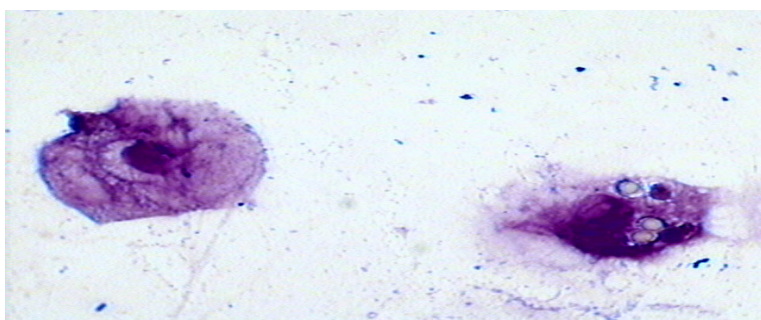
Gambar 1. Grafik hasil penghitungan prosentase makrofag yang memfagositosis partikel lateks masing-masing kelompok.

PEMBAHASAN

Mekanisme pertahanan tubuh terhadap infeksi *Listeria monocytogenes* yang pertama kali bekerja adalah respon imun alami, dimana sel-sel fagosit dalam hal ini makrofag sangat berperan dalam merespon kondisi ini dengan sistem fagositosis. Secara garis besar makrofag memfagosit benda-benda asing infeksius dibagi menjadi 3 tahap xx.

1. Pengenalan dan pengikatan benda asing.
2. Penelanan (ingestion) benda asing
3. Pencernaan (digestion) benda asing.

Setelah proses fagositosis, diikuti dengan proses pembunuhan kuman (*killing*). Tetapi bakteri intraseluler ini dapat luput dari pencernaan makrofag karena ia resisten terhadap enzim-enzim lisosom fagosit pada makrofag. Selain itu ia juga dapat menghindari mekanisme penghancuran ini dengan cara melubangi dan kemudian keluar dari endosom. Pada kondisi ini hanya makrofag yang teraktifasi yang dapat membunuh bakteri ini atau dapat pula dilakukan oleh limfosit yang teraktifasi lewat presentasi antigen oleh makrofag^{5,13} Pada pemberian stres berupa kejutan listrik pada mencit betina BALB/c ternyata terbukti secara bermakna dapat menurunkan kemampuan fagositosis makrofagnya. (gambar 2).



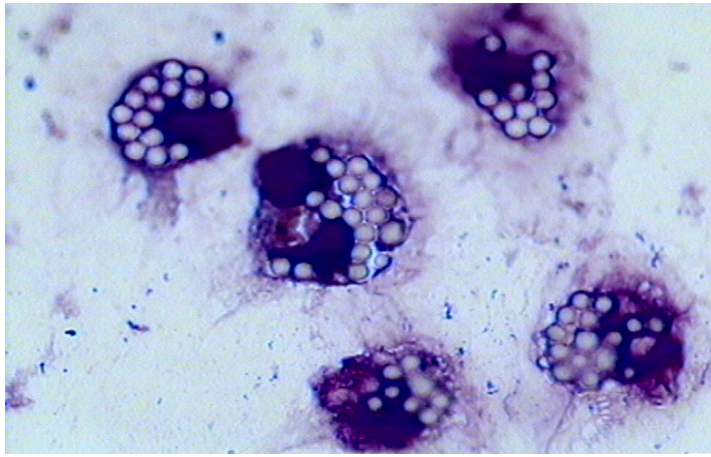
Gambar 2. Makrofag yang tidak memfagositosis partikel lateks

Pada penelitian ini didapatkan adanya perbedaan yang bermakna antara prosentase makrofag yang memfagositosis partikel lateks pada mencit BALB/c yang diberi stres dan mendapat vaksinasi BCG dibanding yang tidak mendapat vaksinasi BCG. Prosentase makrofag yang memfagositosis partikel lateks lebih rendah pada kelompok mencit BALB/c yang diberi stres tanpa vaksinasi BCG dibanding yang mendapat vaksinasi BCG. Rendahnya prosentase makrofag yang memfagositosis partikel lateks pada kelompok stres kemungkinan

disebabkan oleh beberapa faktor yang mempengaruhi aktivitas fagositosis makrofag. Hasil penelitian ini didukung oleh penelitian sebelumnya yaitu stres melalui hormon katekolamin dapat menekan sintesis IL-12 dan meningkatkan produksi IL-10. Ini dapat menyebabkan pergeseran fenotip T helper CD_4^+ dari Th_1 yang berfungsi dalam imunitas seluler ke Th_2 yang melibatkan produksi antibodi^{xxi}. Penelitian manusia yang dilakukan Marshall terhadap mahasiswa yang stres karena ujian (stres akademik) menunjukkan bahwa stres psikologis akan menyebabkan pergeseran keseimbangan sistem imun ke Th_2 . Data menunjukkan penurunan sintesis sitokin Th_1 termasuk interferon- γ (IFN- γ), dan peningkatan sitokin Th_2 termasuk IL-10. Sehingga dipercaya bahwa stres akan menyebabkan penurunan sitokin Th_1 yang akhirnya mengacaukan respon imunitas seluler.^{xxii}

Lebih tingginya prosentase makrofag yang memfagositosis partikel lateks pada kelompok Stres+BCG bila dibandingkan dengan kelompok Stres kemungkinan disebabkan karena pemberian BCG dapat memacu fungsi makrofag, sel T, sel B dan sel NK untuk memproduksi IL-1^{xxiii}. Penggunaan dosis BCG yang tepat akan menginduksi respon imunitas seluler melalui respon Type1. Dalam penelitian Power dkk dibuktikan bahwa BCG dalam dosis rendah akan memacu respon Type1, sementara semakin tinggi dosisnya akan menghasilkan campuran respon Type1 dan Type2.^{xxiv} BCG dapat memacu proliferasi limfosit dan akan mengaktifasi respon imun tipe 1 yaitu dengan meningkatkan IL-12, IFN- γ dan TNF.^{xxv} Pemberian BCG secara invitro, seperti yang dilakukan Demangel dkk, akan memacu maturasi sel-sel dendritik yang ditunjukkan dengan peningkatan ekspresi antigen MHC kelas II, molekul kostimulator CD 80 dan CD 86. Sintesis mRNA untuk IL-1, IL-6, IL-12, IL-10 dan antagonis reseptor IL-1 juga meningkat.^{xxvi}

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa BCG dapat memperbaiki fungsi kemampuan fagositosis makrofag yang kemungkinan dengan mengaktifasi respon imun tipe 1 yaitu dengan meningkatkan IL-12, IFN- γ dan TNF. Pacuan-pacuan yang dilakukan BCG dapat diamati dari prosentase makrofag yang memfagositosis partikel lateks pada kelompok EFS+BCG. (gambar 3).



Gambar 3. Makrofag yang sedang memfagositosis partikel lateks

Hasil yang diharapkan pada kelompok BCG tidak terbukti dan tidak sesuai penelitian-penelitian sebelumnya, kemungkinan disebabkan faktor pertama, terdapat keterbatasan pada pemeriksaan dengan menggunakan mikroskop cahaya yang sangat subjektif, faktor kedua, pada pemeriksaan prosentase makrofag yang memfagositosis partikel lateks tidak memperhitungkan jumlah partikel lateks yang difagositosis oleh makrofag.

SIMPULAN

Pengaruh stres akan menekan aktivitas makrofag, dan upaya penggunaan BCG dapat meminimalkan efek tersebut dengan meningkatkan kemampuan fagositosis makrofag, yang diukur dengan prosentase makrofag yang memfagositosis partikel lateks.

UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih kami sampaikan kepada Kepala dan Staf Laboratorium Bioteknologi Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro, Kepala dan Staf Laboratorium Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro dan Kepala dan Staf Laboratorium Kesehatan Semarang atas bantuan dan kesempatan yang diberikan untuk menggunakan fasilitas laboratorium untuk terlaksananya penelitian ini.

-
- i Baratawidjaja,KG.Imunologi Dasar.Edisi5.Jakarta.Balai Penerbitan FKUI.2002:59-62,190-192
- ii Rice,Phillip L.Stress And Health:Principle and practice for coping and wellness.Califonia.Brooks/Cole Publishing Company asific Grove.1984:20-21,50-51
- iii Koehler,Hannah.Stress and immune system.[on line] URL: <http://www.econ.uiuc.edu/~harco/bio/stress.html>.1994
- iv Dohm,J.E.Metz,A.Stress mechanism of immunosuppression.Vet immunolimmunopathol.1991 nov;30 (1):89-109
- v Jawetz E,Melnick JL,Adelberg E.A.brook GF,Butel Js,Orsntor LN.Microbiologi Kedokteran.Editor:Irawati S.Edisi 20.Jakarta:EGC.1996:243-245
- vi Dwi Pudjonarko, Soesilo Wibowo, Edi Dharmana, Hermina Sukmaningtyas, Neni Susilaningsih. Pengaruh pemberian BCG terhadap kemampuan makrofag sebagai APC pada mencit tua yang mendapat diet minyak ikan. Media Medika Indonesiana 2001; 36(4): 209-16.
- vii Lowry PW, Ludwig TS, Adams JA, Fitzpatrick ML, Grant SM, Andrle GA, Offerdahl MR, Cho SN, Jacobs DR Jr. Cellular Immune responses to four doses of percutaneous baccile Calmette-Guerin in healthy adults. J Infect Dis 1998 Jul; 178(1): 138-46.
- viii Djamiatun K, Dharmana E, Kristina T, Indar R. Pengaruh Vitamin A dan BCG pada Produksi TNF- α dan aktivitas fagositik Makrofag Terhadap Staphylococcus Aureus.Laporan Akhir Tahun I Risbin Iptekdok, 1998.
- ix Demangel C, Bean AG, Martin E, Feng CG, Kamath AT, Britton WJ. Protection against aerosol Mycobacterium tuberculosis using Mycobacterium bovis Bacillus Calmette Guerin-infected dendritic cells. Eur J Immunol 1999 Jun; 29(6):1972-9.
- x Slover CK, Bansal GP, Langerman S, Hanson MS. Protective immunity elicited by rBCG vaccines. Dev Biol Stand 1994; 82: 163-70.
- xi Pratiknya AW. Dasar-dasar Metodologi Penelitian kedokteran dan kesehatan. Cetakan I. Jakatra: CV Rajawali, 1986: 147-65.
- xii Hadi Sutrisno. Metodologi Research jilid 4. edisi ke-8. Yogyakarta: Andi Offset.1995:433-36.
- xiii Ryan JL. Bacterial Disease. Dalam. Stites DP.Terr Al eds. Basic and Clinical Immunology. 8 ed. Connecticut:Appleton & Lange. 1994: 627-36.
- xiv Hokama Y, Nakamura RM. Immunology and immunopathology basic concepts. 1st ed. Boston: Little. Brown and Company. 1982
- xv Nurgiyantoro B, Gunawan, Marzuki. Statistik Terapan untuk Penelitian Ilmu-ilmu Sosial. Yogyakarta: Gadjah Mada University Press. 2000:176-211.
- xvi Pollet A, Nasrullah. Penggunaan Metode Statistik Untuk Ilmu Hayati. Yogyakarta: Gadjah Mada University Press. 1994:281-344
- xvii Santoso Singgih. SPSS (Statistical Product and Service Solution). Jakarta: PT. Elex Media Komputindo. 1999:300-80.
- xviii Santoso Singgih. Buku Latihan SPSS Statistik Parametrik. Jakarta: PT. Elex Media Komputindo. 2000:108-25.

-
- ^{xix} Tim Penelitian dan Pengembangan WAHANA KOMPUTER Semarang. Panduan Lengkap: SPSS 6.0 for Windows. Semarang: Wahana Komputindo & Andi Offset. 1997: 123-88, 380-85.
- ^{xx} Bagian Patologi Klinik Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro. Diktat Pegangan Kuliah Patologi Klinik II. Semarang. 1999 : Tengah Semester I
- ^{xxi} Padgett DA, Glaser R. How Stress influences the immune response. *TRENDS in immunology* August 2003; 24(8): 444-8
- ^{xxii} Elemkov IJ and Chrousos GP. Stress hormones, Th1/th2 patterns, Pro/Anti-inflammatory Cytokines and susceptibility to disease. *TEM* 1999;10(9):359-68
- ^{xxiii} Hennesey LR & Baker JR. Immunomodulator in Basic and Clinical Immunology edited by Stites DP. Terr Al. 8th ed. Conecticut: Appleton and Lange. 1994:781-85.
- ^{xxiv} Padgett DA. Restraint stress slows cutaneous wound healing in mice. *Brain Behav Immun* 1998; 12: 64-73
- ^{xxv} Wakeham J, Wang J, Magram J, Croitoru K, Harkness R, Dunn P, Zganiacz A, Xing F, Lack of both types 1 and 2 cytokines, tissue inflammatory responses, and immune protection during pulmonary infection by *Mycobacterium bovis* bacilli Calmette-Guerin in IL-12 defifient mice. *J Ummunol* 1008 Jun 15:160(12):6101-11.
- ^{xxvi} Djamiatun K, Dharmana E, Kristina T, Indar R. Pengaruh Vitamin A dan BCG pada Produksi TNF- α dan aktivitas fagositik Makrofag Terhadap *Staphylococcus Aureus*. Laporan Akhir Tahun I Risbin Iptekdok, 1998.