

**PENGARUH PEMBERIAN VAKSINASI BCG, STRES, DAN KOMBINASI VAKSINASI
BCG – STRES TERHADAP KEMAMPUAN PRODUKSI NO MAKROFAG PADA
MENCIT BALB/c**

ARTIKEL PENELITIAN

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

Oleh

Rohaida binti Zakaria

G2A 902001

**FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS DIPONEGORO
SEMARANG**

2006

LEMBAR PENGESAHAN

ARTIKEL ILMIAH

Pengaruh Pemberian Vaksinasi BCG, Stres, dan Kombinasi Vaksinasi BCG – Stres Terhadap Kemampuan Produksi NO Makrofag pada Mencit Balb/c

Yang dipersiapkan dan disusun oleh :

Rohaida binti Zakaria
G2A 902001

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

Tim Penguji

THE EFFECTS OF BCG VACCINE, STRESS, AND COMBINATION OF BCG VACCINE – STRESS TO THE ABILITY OF NO PRODUCTION OF MACROPHAGE IN BALB/C MICE.

Rohaida Zakaria¹⁾, Dwi Pudjonarko²⁾

ABSTRACT

Background: Stress may cause immunity impairment especially in cellular immunity responses, while BCG vaccination may increase it. This particular study is designed using mice as a model.

Objective: The aim of this study was emphasized on the effects of BCG vaccine, stress and combination of BCG vaccine – stress in cellular immune responses alteration through concentration of NO (Nitric Oxide) production of macrophage.

Method and subject: This study adapts laboratory experimental and Post Test Only Control Groups Design. The 24 female BALB/c (6 – 8 weeks old and average weight 21.48 ± 1.70 grams) are obtained from PUSVETMA (Pusat Veterinaria Farma) Surabaya. All mice then divided into four groups and received standard lab diet daily. The first group (control group / K) received no other additional treatment. While the second group (BCG group / BCG) receives intra peritoneal injection of 0.1cc BCG at day 1st and day 14th. The third group (stress group / EFS) received stressed by electrical foot shock start on day 12th until day 21st and the fourth group (Stress + BCG group / EFS+BCG) received intra peritoneal injection of 0.1cc BCG at day 1st and 14th and stressed by electrical foot shock start on day 12th until day 21st. At day 21st, all groups were injected 0.1cc intravenously with 10^5 live *Listeria monocytogenes* ($LD_{50} = 2 \times 10^5$ bacteria) obtained from Balai Laboratorium Kesehatan Semarang and terminated at day 26th. The macrophage activity was measured by concentration of NO production of macrophage. Within group difference of data were analyzed by One Way ANOVA. Difference between groups was analyzed by Post Hoc Test Bonferroni

Result: There are significant difference in the concentration NO production of macrophage ($p < 0.05$) among groups. The lowest concentration of NO production was found in the EFS group. In contrast, there are no significant differences on the NO production between EFS+BCG and control ($p > 0.05$).

Conclusion: It could be concluded that stress is immunosuppressant, while additional treatment with BCG can restore immune responses indicated by the increase of concentration of NO production of macrophage in BALB/c mice.

Key words: BCG, Stress, Nitric Oxide.

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

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

PENGARUH PEMBERIAN VAKSINASI BCG, STRES, DAN KOMBINASI VAKSINASI BCG – STRES TERHADAP KEMAMPUAN PRODUKSI NO MAKROFAG PADA MENCIT BALB/c

Rohaida Zakaria¹⁾, Dwi Pudjonarko²⁾

ABSTRAK

Latar Belakang: Stres dapat menyebabkan gangguan fungsi sistem imun tubuh terutama respon imunitas seluler. Disisi lain dilaporkan penggunaan BCG dapat meningkatkan respon imunitas seluler tersebut. Penelitian ini menggunakan mencit sebagai model penelitian.

Tujuan: Penelitian ini bertujuan untuk melihat efek penggunaan vaksinasi BCG, stres, dan kombinasi vaksinasi BCG – stres pada perubahan imunitas seluler dengan melakukan pengukuran konsentrasi produksi NO (*Nitric Oxide*) makrofag.

Metode dan Bahan: 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 rata-rata 21.48 ± 1.70 gram) diperoleh dari PUSVETMA (Pusat Veterinaria Farma) Surabaya. Mencit tersebut dibagi menjadi 4 kelompok dan masing-masing mendapat pakan standar setiap hari. Kelompok pertama (Kelompok Kontrol / K) tidak menerima perlakuan apa pun. Sementara kelompok kedua (Kelompok BCG / BCG) menerima injeksi 0.1cc BCG secara intraperitoneal pada hari ke-1 dan ke-11. Kelompok ketiga (Kelompok Stres / EFS) mendapatkan stres dengan *electrical foot shock* mulai hari ke-12 sampai hari ke-21 dan kelompok keempat (Kelompok Stres + BCG / EFS+BCG) mendapat injeksi 0.1cc 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 monocyogenes* hidup ($LD_{50} = 2 \times 10^5$ bakteri) yang diperoleh dari Balai Laboratorium Kesehatan Semarang dan pada hari ke-26 semua mencit dibunuh untuk pemeriksaan. Analisa perbedaan antara keempat kelompok diuji dengan *One Way ANOVA* dan besarnya perbedaan masing-masing kelompok dianalisis lebih lanjut dengan *Post Hoc Test Bonferroni*.

Hasil: Penelitian mendapatkan adanya perbedaan yang bermakna dalam konsentrasi produksi NO makrofag antara kelompok perlakuan ($p < 0.05$). Pada Kelompok EFS didapatkan konsentrasi produksi NO makrofag terendah dan bermakna bila dibandingkan dengan kelompok lainnya. Sementara Kelompok EFS+BCG menunjukkan tidak ada perbedaan yang bermakna dengan Kelompok Kontrol ($p > 0.05$).

Kesimpulan: Didapatkan bahwa stres menekan sistem imun, sementara pemberian BCG dapat memperbaiki respon imunitas tersebut melalui peningkatan konsentrasi produksi NO makrofag pada mencit BALB/c.

Kata Kunci: BCG, Stres, *Nitric Oxide*.

¹⁾ Mahasiswa Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro Semarang

²⁾ Staf Pengajar Bagian Fisika Medik Universitas Diponegoro Semarang

PENDAHULUAN

Kehidupan dewasa ini dihadapkan dalam tuntutan hidup yang semakin tinggi, baik dari luar atau dari dalam diri seseorang, yang dapat berakibat seseorang mudah mengalami stres. Setiap orang bisa bereaksi berbeda terhadap tuntutan hidup yang sama, bisa bereaksi dengan tenang dan bisa bereaksi dengan marah. Suasana marah, pikiran negatif, dan depresi merupakan stresor yang bisa membahayakan sistem imun tubuh dan berakibat mudah timbulnya penyakit.¹ Stres melalui sistem *Hypothalamic pituitary-adrenocortical* (HPA) axis

akan menyebabkan disekresinya hormon kortisol oleh kelenjar adrenal. Peningkatan kadar kortisol akan menurunkan produksi IL-1 oleh makrofag dan IL-2 oleh sel Th, sehingga terjadi gangguan keseimbangan berupa penurunan IFN- γ dan didominasi dari IL-4.ⁱⁱ

Dalam ilmu imunologi dikenal beberapa substrat yang dapat memodulasi sistem imun. Salah satunya adalah yang bersifat imunopotensiator yang banyak dipelajari untuk menambah reaktivitas imunologis. Imunopotensiator tersebut adalah *Mycobacterium Bovis* yang dilemahkan yaitu strain Bacillus Calmette-Guerin (BCG).^{iii,iv} BCG 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.^v Penggunaan dosis BCG yang tepat akan menginduksi respon imunitas seluler melalui peningkatan sitokin respon imun tipe I yaitu IL-12, IFN- γ , dan TNF- α yang berfungsi mengaktifasi makrofag.^{vi} Makrofag yang teraktivasi akan memproduksi dua oksidan anorganik yang berperan dalam mekanisme anti tumor dan anti bakteri, yaitu *Reactive Oxygen Intermediates* (ROI) dan *Reactive Nitrogen Intermediate* (RNI). Yang termasuk dalam RNI adalah NO, nitrit dan nitrat.^{6,vii}

Ketika makrofag teraktivasi, maka *Nitrogen Oksida Sintase* (NOS) yang mengkatalisa terbentuknya NO akan meningkat.^{viii,ix}

Dengan demikian sejumlah NO akan diproduksi.^x Peningkatan NO ini seiring dengan peningkatan IFN- γ .^{xi} IFN- γ mempunyai peran mengaktifkan makrofag yang mempunyai peran penting dalam menghadapi kuman intraseluler seperti *Listeria monocytogenes*.²

Listeria monocytogenes merupakan bakteri intraseluler yang banyak digunakan sebagai model dalam mempelajari infeksi bakteri intraseluler. Bakteri ini dapat bertahan hidup di dalam makrofag dan menghindari mekanisme bakterisidal oleh makrofag. Adanya *Listeria monocytogenes* dalam makrofag akan membuat makrofag memproduksi IL-2 yang akan menstimuli sel NK, membantu diferensiasi Th0 menjadi Th1 dan menstimulasi CD8⁺ CTLs. Ketiga sel ini akan mensekresi IFN- γ , yang berfungsi mengaktifasi makrofag, untuk memproduksi oksigen reaktif, menstimulasi produksi antibodi dan mengopsonisasi bakteri dengan tujuan akhir

membantu fungsi efektor makrofag.^{xii}

Penelitian ini berusaha menjawab apakah pemberian BCG dapat mencegah penurunan aktivitas makrofag yang dilihat dari konsentrasi produksi NO makrofag mencit yang tertekan karena stres. Tujuan penelitian ini untuk menganalisa perbedaan konsentrasi produksi NO makrofag pada mencit BALB/c dengan stres tanpa vaksinasi BCG dibanding dengan yang divaksinasi BCG. Hasil penelitian ini diharapkan dapat menjadi bahan informasi dalam penggunaan imunomodulator sebagai pencegahan terjadinya penurunan respon imunitas seluler karena stres. Pemberian BCG pada penelitian ini hanya merupakan salah satu pemberian imunomodulator yang telah banyak diteliti. Dalam penelitian selanjutnya bisa diberikan jenis imunomodulator lain yang sangat banyak ditawarkan di pasaran.

METODE PENELITIAN

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorik, dengan pendekatan *The Post Test Only Control Group Design* yang menggunakan binatang percobaan sebagai objek penelitian.^{xiii}

Sampel penelitian ini adalah 24 ekor mencit yang didapat dari PUSVETMA (Pusat Veterinaria Farma) Surabaya. Untuk menghindari bias dalam penelitian maka dikontrol hal-hal berikut faktor keturunan mencit (diambil mencit yang secara genetis sifatnya sama, yaitu mencit BALB/c), umur mencit (mencit berusia 6-8 minggu), jenis kelamin (betina), berat badan sebelum percobaan (21.48 ± 1.70 gram), penempatan kandang (ditempatkan pada tempat yang sama dan dikandang secara individual), kebersihan (frekuensi dan kualitas pembersihan dilakukan sama untuk tiap mencit), cara pemberian makanan (pada jam-jam 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*. Setelah menjalani masa adaptasi, mencit kemudian dibagi menjadi 4 kelompok percobaan dengan rancangan acak lengkap (*Completely Randomized Design*), randomisasi sederhana dilakukan menggunakan komputer. Semua mencit mendapatkan makanan standar laboratoris. Pada Kelompok Kontrol, mencit tidak mendapatkan perlakuan. Sementara

Kelompok BCG menerima injeksi 0.1cc BCG secara intraperitoneal pada hari ke-1 dan ke-11. Kelompok EFS mendapatkan stres dengan *electrical foot shock* mulai hari ke-12 sampai hari ke-21. Dan Kelompok EFS+BCG mendapat injeksi 0.1cc 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 intravena dengan 10^4 *Listeria monocytogenes* hidup ($LD_{50} = 2 \times 10^5$ bakteri) yang diperoleh dari Balai Laboratorium Kesehatan Semarang. Semua mencit dibunuh dengan pemberian chloroform yang dilanjutkan dengan dislokasi leher pada hari ke-26.

Data hasil penelitian diolah dan disajikan dalam bentuk tabel dan grafik. Data dari keempat kelompok perlakuan tersebut dianalisis normalitasnya dengan uji normalitas *Kolmogorov – smirnov*. Karena distribusi datanya normal maka dilakukan uji *One Way ANOVA* untuk melihat perbedaan pada keempat kelompok perlakuan. Besarnya perbedaan masing-masing kelompok dianalisis lebih lanjut dengan *Post Hoc Test Bonferroni*. Semua analisis data tersebut dilakukan dengan menggunakan program komputer *SPSS 13.0 for windows*.^{xiv,xv} Nilai bermakna pada penelitian ini apabila variabel yang dianalisis memiliki nilai $p < 0,05$.

PROSEDUR PEMERIKSAAN

Pemeriksaan dilakukan dengan mengisolasi makrofag peritoneal. *Peritoneum Exudate Cells* (PEC) hewan coba dengan kepadatan 10^6 sel/ml diinkubasi pada 37°C dengan kadar CO_2 5% selama 2 jam dalam plate *24 wells*. Setelah diganti medium, makrofag dikultur dalam inkubator pada suhu 37°C , dengan kadar CO_2 5% selama 24 jam.^{xvi} Kemudian pemeriksaan konsentrasi produksi NO makrofag dilakukan dengan metode Griess dengan menggunakan *96 wells microplate* ELISA dasar rata. $100\mu\text{l}$ supernatan yang diperiksa dan standar NaNO_2 dipipet kedalam plate. Kemudian dicampurkan dengan $100\mu\text{l}$ reagen chromogenic. Ditunggu selama 5 menit pada suhu ruang untuk pembentukan *chromophore* dan stabilisasi.^{xvii}

Absorbansi diukur pada 550nm menggunakan *Biotrax II Plate Reader*. Dari hasil pembacaan standar NaNO_2 dibuat kurva standar menggunakan analisis regresi linier. Konsentrasi sampel seterusnya dihitung berdasarkan rumus regresi yang diperoleh yaitu :

$$\text{Konsentrasi} = (654.048 \times \text{absorbansi}) - 1.834$$

HASIL PENELITIAN

Hasil pemeriksaan konsentrasi produksi NO makrofag yang dihasilkan keempat kelompok perlakuan disajikan dalam tabel analisis data seperti berikut. (Tabel 1).

Tabel 1. Konsentrasi produksi NO makrofag

Kelompok	n	Rerata	SB	Minimal	Maksimal
Kontrol	6	4.27	1.41	2.09	6.01
BCG	6	7.21	1.27	5.63	8.63
EFS	6	0.67	0.64	0.13	1.44
BCG + EFS	6	5.25	1.05	4.05	6.67

One Way ANOVA → $F=35.309$; $p=0.000$

Jumlah konsentrasi produksi NO makrofag paling rendah pada kelompok mencit yang mendapat EFS (0.67 ± 0.64) dan paling tinggi pada kelompok mencit yang mendapat BCG (7.21 ± 1.27). Analisis statistik dengan menggunakan *One Way Anova*, ternyata terdapat perbedaan yang bermakna ($p=0.000$) pada jumlah konsentrasi produksi NO makrofag antara 4 kelompok percobaan. Karena varian-varian konsentrasi produksi NO pada kelompok ini homogen maka dilakukan analisis lebih lanjut dengan *Post Hoc Test Bonferroni* untuk melihat perbedaan antara kelompok. (Tabel 2).

Tabel 2. Hasil uji Bonferroni untuk masing-masing kelompok percobaan.

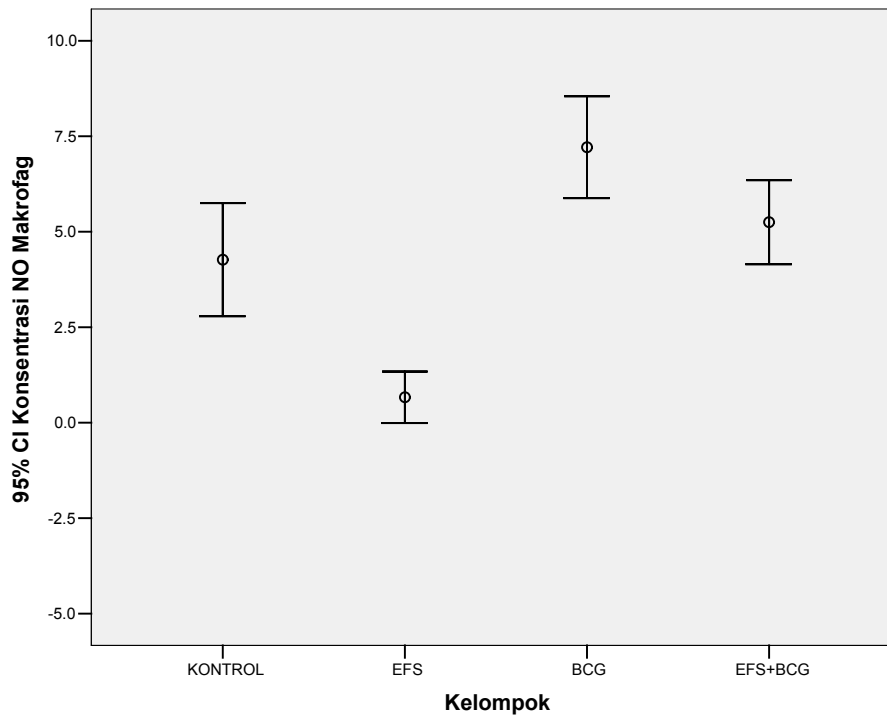
Konsentrasi produksi NO makrofag.

Post Hoc Test Bonferroni	Rerata	Kontrol	BCG	EFS	EFS+BCG
Kontrol	4.27	-	$p=0.001^*$	$p=0.000^*$	$p=0.891$
BCG	7.21	$p=0.001^*$	-	$p=0.000^*$	$p=0.042^*$
EFS	0.67	$p=0.000^*$	$p=0.000^*$	-	$p=0.000^*$
EFS+BCG	5.25	$p=0.891$	$p=0.042^*$	$p=0.000^*$	-

* Perbedaan rerata bermakna pada $p<0.05$

Apabila konsentrasi NO makrofag kelompok EFS dibandingkan dengan kontrol maka didapatkan perbedaan yang bermakna ($p=0.000$) demikian juga apabila dibandingkan dengan kelompok BCG ($p=0.000$) dan

EFS+BCG ($p=0.000$). Konsentrasi produksi NO makrofag pada kelompok EFS+BCG didapatkan sebesar (5.25 ± 1.05) yang tidak berbeda bermakna dengan kelompok kontrol ($p=0.891$) tetapi berbeda bermakna dengan kelompok EFS ($p=0.000$) dan BCG ($p=0.042$).



Gambar 1. Boxplot konsentrasi NO makrofag masing – masing kelompok

PEMBAHASAN

Listeria monocytogenes merupakan bakteri intraseluler. Bakteri ini dapat bertahan hidup di dalam makrofag dan menghindari mekanisme bakterisidal oleh makrofag. Adanya *Listeria monocytogenes* dalam makrofag akan membuat makrofag memproduksi IL-2 yang akan menstimuli sel NK, membantu diferensiasi Th0 menjadi Th1 dan menstimulasi CD8⁺ CTLs. Ketiga sel ini akan mensekresi IFN- γ , yang berfungsi mengaktivasi makrofag, untuk memproduksi oksigen reaktif.¹² Ketika makrofag teraktivasi, maka *Nitrogen Oksida Sintase* (NOS) yang mengkatalisa terbentuknya NO akan meningkat. Dengan demikian sejumlah NO akan diproduksi.^{8,12}

Pada penelitian ini didapatkan konsentrasi produksi NO pada kelompok BCG paling tinggi jika dibandingkan dengan kelompok lain, ini disebabkan karena pemberian BCG dapat memacu fungsi makrofag, sel

T, sel B, dan sel NK untuk memproduksi IL-12, IFN- γ dan TNF- α . 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.^{xviii} Didukung lebih lanjut oleh penelitian Carpenter dkk yaitu adanya peningkatan produksi NO pada makrofag lembu yang divaksinasi BCG dan bila dibanding dengan kontrol perbedaannya sangat bermakna.¹¹

Hal yang sebaliknya terjadi pada kelompok EFS, pada kelompok ini didapatkan konsentrasi produksi NO yang paling rendah. Hal ini sesuai dengan teori bahwa pengaruh stres dapat memberi beban pada sel saraf pusat, yang kemudian akan menimbulkan perubahan pada sistem imunologik melalui jalur endokrin dan saraf otonom. Jalur ini disebut *Hypothalamic Pituitary Adrenal-axis* (HPA-axis). Stres kemudian menyalurkan sinyal ke bagian posterior medial hipotalamus untuk mensekresi *Corticotropin Releasing Factor* (CRF). CRF mengakibatkan *axis* HPA menjadi aktif, berupa peningkatan ACTH yang akan merangsang korteks adrenal yang akan mengakibatkan peningkatan sekresi kortisol. Stres juga merangsang saraf otonom simpatik dan medula adrenal mengeluarkan katekolamin (adrenalin dan noradrenalin).^{xix} Berdasarkan pada macam sitokin yang diproduksi, maka limfosit Th0 berdiferensiasi menjadi limfosit T helper (Th) dan limfosit T cytotoxic (Tc). Limfosit berdiferensiasi pula atas Th1 yang memproduksi IFN- γ dan Th2 yang memproduksi IL-4. Dalam keadaan normal, limfosit Th1 dan Th2 saling berimbang. Peningkatan kadar kortisol akan menurunkan produksi IL-1 oleh makrofag dan IL-2 oleh sel Th, yang berakibat terjadi gangguan keseimbangan berupa penurunan IFN- γ dan didominasi oleh IL-4.² Penurunan IFN- γ akan seiring dengan penurunan produksi NO.¹¹

Pada kelompok stres yang diberi BCG didapatkan konsentrasi NO makrofag lebih tinggi dibanding kelompok yang tidak mendapat vaksinasi BCG dan ada perbedaan yang bermakna. Sesuai yang diharapkan pada hipotesis penelitian, penelitian ini membuktikan bahwa BCG dapat meningkatkan kemampuan produksi NO makrofag pada mencit balb/c, stres dapat menurunkan dan BCG dapat mencegah penurunan kemampuan produksi NO makrofag pada mencit balb/c yang mengalami stres.

SIMPULAN

Vaksinasi BCG dapat meningkatkan konsentrasi produksi NO makrofag dan stres dapat menurunkan. Didapatkan perbedaan yang bermakna konsentrasi produksi NO makrofag mencit stres yang divaksinasi BCG dibanding yang tidak ($p=0.042$). Stres menekan produksi NO makrofag dan penggunaan BCG dapat mencegah atau meminimalkan efek tersebut dengan memperbaiki aktivitas respon seluler melalui peningkatan produksi NO makrofag.

SARAN

Perlu penelitian lebih lanjut mengenai faktor-faktor yang mempengaruhi kemampuan produksi NO makrofag, misalnya pemeriksaan keseimbangan produksi IFN- γ dan IL-4. IFN- γ merupakan marker pergeseran respon imun ke Type1 dan IL-4 adalah marker pergeseran respon imun ke Type2.

UCAPAN TERIMA KASIH

Syukur kepada Allah SWT sehingga terselesainya artikel ini. Terima kasih pada staf-staf Balai Laboratorium Kesehatan Semarang, Laboratorium Bioteknologi Universitas Diponegoro, Bagian Biokimia Universitas Diponegoro, dan semua pihak yang terlibat dalam proses penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

1. Ensiklopedia Nasional Indonesia. Jilid 15. PT. Cipta Adi Pustaka. Jakarta:191.260-261.
2. Tjokronegoro A. Meningkatkan daya tahan tubuh dalam kehidupan sehari – hari: Suatu tinjauan Biologis. Seminar sehari AG Businessman Fellowship. Jakarta: 14 Agustus 2001.
3. Ryan JL. Bacterial disease in Basic and Clinical Immunology edited by Stites DP, Terr AI, 8th ed. Connecticut : Appleton and Lange,1994: 627 - 36
4. Hokama Y, Nakamura RM, Immunology and Immunopathology basic concept. 1st ed. Boston: Little, Brown and Company,1982.
5. Shanahan JF, Bayley and Scott's Diagnostic Microbiology. 9th ed. Missouri: Mosby Year – book, 1994: 321 – 30
6. Joklik WK, Willet HD, Amos DB, Wilfert CM, Zinsser microbiology. 19th ed. New York Prentice Hall International, 1993.
7. Wahab SA, Julia MPH. Sistem Imun, Imunisasi dan Penyakit Imun. Jakarta: Widya Medika, 2002: 21-3
8. Garrel C, et al. Detection and Production of Nitric Oxide. In: Favier et al (editors). Analysis of Free Radicals in Biological System. Switzerland: Birkhäuser Verlag Basel, 1995:279
9. 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.
10. <http://en.wikipedia.org/wiki/nitric-oxide>, access on July 3, 2006.
11. Carpenter E, Fray L, Gormley E. Antigen-specific lymphocytes enhance nitric oxide production in Mycobacterium bovis BCG-infected bovine macrophages. Immunol Cell Biol 1998 Aug; 76(4): 363-8.
12. Abbas AK, Lichtman AH. Cellular and Molecular Immunology. Fifth edition. Philadelphia: Saunders, 2003. 275-97
13. Pratiknya AW. Dasar-dasar Metodologi Penelitian kedokteran dan kesehatan. Cetakan I. Jakarta: CV

- Rajawali, 1986: 147-65.
14. Chandra Budiman. Pengantar Statistik Kesehatan. Jakarta: EGC, 1995: 1-96.
 15. Santoso Singgih. SPSS (Statistical Product and Service Solution). Jakarta: PT. Elex Media Komputindo, 1999: 300-80.
 16. Supargiyono. Mononuclear Phagocyte System (MPs). Makalah pada: Kuliah Defisiensi Biologi Molekuler & Immunologi. Yogyakarta: Tim Pengelola Program Doktor FK UGM, 29 Jan 2000-18 Mar 2000: 1-9.
 17. Dieterd RR, Hotchkiss JH, Austic RE, Yen-Jen Sung. Production of Reactive Nitrogen Intermediates by Macrophages. In: Burleson GR, Dean JH, Munson AE eds. Methods in Immunotoxicology, Vol 2. New York -Chichester-Brisbane-Toronto-Singapore: A John Willey & Sons. Inc, 1995: 99-117.
 18. Padgett DA. Restraint stress slows cutaneous wound healing in mice. Brain Behav Immun 1998; 12: 64-73
 19. Guyton AC.Hall JE. Efek penghambat dari kortisol terhadap hipotalamus dan terhadap kelenjar hipofisis anterior yang menyebabkan penurunan sekresi ACTH. Dalam: Buku ajar Fisiologi kedokteran. Edisi 9.I.EGC.Jakarta:1996.1215-1216.

-
- ⁱ Ensiklopedia Nasional Indonesia. Jilid 15. PT. Cipta Adi Pustaka. Jakarta:191.260-261.
- ⁱⁱ Tjokronegoro A. Meningkatkan daya tahan tubuh dalam kehidupan sehari – hari: Suatu tinjauan Biologis. Seminar sehari AG Businessman Fellowship. Jakarta: 14 Agustus 2001.
- ⁱⁱⁱ Ryan JL. Bacterial disease in Basic and Clinical Immunology edited by Stites DP, Terr AI, 8th ed. Connecticut : Appleton and Lange,1994: 627 - 36
- ^{iv} Hokama Y, Nakamura RM, Immunology and Immunopathology basic concept. 1st ed. Boston: Little, Brown and Company,1982.
- ^v Shanahan JF, Bayley and Scott's Diagnostic Microbiology. 9th ed. Missouri: Mosby Year – book, 1994: 321 – 30
- ^{vi} Joklik WK, Willet HD, Amos DB, Wilfert CM, Zinsser microbiology. 19th ed. New York Prentice Hall International, 1993.
- ^{vii} Wahab SA, Julia MPH. Sistem Imun, Imunisasi dan Penyakit Imun. Jakarta: Widya Medika, 2002: 21-3
- ^{viii} Garrel C, et al. Detection and Production of Nitric Oxide. In: Favier et al (editors). Analysis of Free Radicals in Biological System. Switzerland: Birkhäuser Verlag Basel, 1995:279
- ^{ix} 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.
- ^x <http://en.wikipedia.org/wiki/nitric-oxide>, access on July 3, 2006.
- ^{xi} Carpenter E, Fray L, Gormley E. Antigen-specific lymphocytes enhance nitric oxide production in Mycobacterium bovis BCG-infected bovine macrophages. Immunol Cell Biol 1998 Aug; 76(4): 363-8.
- ^{xii} Abbas AK, Lichtman AH. Cellular and Molecular Immunology. Fifth edition. Philadelphia: Saunders, 2003. 275-97
- ^{xiii} Pratiknya AW. Dasar-dasar Metodologi Penelitian kedokteran dan kesehatan. Cetakan I. Jakarta: CV Rajawali, 1986: 147-65.
- ^{xiv} Chandra Budiman. Pengantar Statistik Kesehatan. Jakarta: EGC, 1995: 1-96.
- ^{xv} Santoso Singgih. SPSS (Statistical Product and Service Solution). Jakarta: PT. Elex Media Komputindo, 1999: 300-80.
- ^{xvi} Supargiyono. Mononuclear Phagocyte System (MPs). Makalah pada: Kuliah Defisiensi Biologi Molekuler & Immunologi. Yogyakarta: Tim Pengelola Program Doktor FK UGM, 29 Jan 2000-18 Mar 2000: 1-9.
- ^{xvii} Dieterd RR, Hotchkiss JH, Austic RE, Yen-Jen Sung. Production of Reactive Nitrogen Intermediates by Macrophages. In: Burleson GR, Dean JH, Munson AE eds. Methods in Immunotoxicology, Vol 2. New York -Chichester-Brisbane-Toronto-Singapore: A John Willey & Sons. Inc, 1995: 99-117.
- ^{xviii} Padgett DA. Restraint stress slows cutaneous wound healing in mice. Brain Behav Immun 1998; 12: 64–73
- ^{xix} Guyton AC.Hall JE. Efek penghambat dari kortisol terhadap hipotalamus dan terhadap kelenjar hipofisis anterior yang menyebabkan penurunan sekresi ACTH. Dalam: Buku ajar Fisiologi kedokteran. Edisi

