



**PENGARUH PEMBERIAN VAKSINASI BCG TERHADAP
JUMLAH KUMAN HEPAR MENCIT BALB/c STRES YANG
TERINFEKSI *Listeria Monocytogenes***

ARTIKEL PENELITIAN

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

Oleh

Amelya Permata Sari

G2A003013

**FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS DIPONEGORO
SEMARANG**

2007

LEMBAR PENGESAHAN

ARTIKEL ILMIAH

**PENGARUH PEMBERIAN VAKSINASI BCG TERHADAP
JUMLAH KUMAN HEPAR MENCIT BALB/c STRES YANG
TERINFEKSI *Listeria Monocytogenes***

Yang dipersiapkan dan disusun oleh :

Amelya Permata Sari
G2A003013

Telah dipertahankan di depan tim penguji Karya Tulis Ilmiah Fakultas Kedokteran
Universitas Diponegoro Semarang pada tanggal 27 Juli 2007

Tim Penguji

Ketua Penguji

Penguji

(dr Dodik Pramono)
NIP. 132 151 947

(dr.Ratna Damma P, M.Kes)
NIP. 131 916 037

Pembimbing

(dr. Dwi Pudjonarko, M.Kes,Sp.S)
NIP. 132 137 931

**THE EFFECTS OF BCG VACCINE TO THE BACTERIAL NUMBER ON
STRESS BALB/c'S LIVER INFECTED WITH *Listeria Monocytogenes***

Amelya Permata Sari¹⁾, Dwi Pudjonarko²⁾

ABSTRACT

Background: Stress may cause immunity impairment especially in cellular immunity responses, while BCG vaccination may increase it.

Objective: The aim of this study was to prove the bacterial number on stress BALB/c's liver, infected with *Listeria monocytogenes* which was vaccinated with BCG was lower than the mice which was not vaccinated with BCG.

Method and subject: This study adapts laboratory experimental and Post Test Only Control Groups Design. The 24 female BALB/c divided into four groups and received standard lab diet daily. The Control group (C) received no other additional treatment. The Stress group (EFS) received stressed by electrical foot shock start on day 12th until day 21st. The BCG group received intra peritoneal injection of 0.1cc BCG at day 1st and day 11th and the EFS+BCG group received intra peritoneal injection of 0.1cc BCG at day 1st and 11th and stressed by electrical foot shock start on day 12th until day 21st. At day 21st, all groups were injected intravenously with 10⁴ live *Listeria monocytogenes* (LD₅₀ = 2x10⁵ bacteria). The mice were killed at day 26th.

Result: There are significant difference on bacterial number between EFS and EFS+BCG ($p < 0.05$). In contrast, there are no significant differences on bacterial number between EFS+BCG and C ($p > 0.05$).

Conclusion: the bacterial number on stress BALB/c's liver, infected with *Listeria monocytogenes* which was vaccinated with BCG was significantly lower than the mice which was not vaccinated with BCG.

Key words: BCG, Stress, bacterial number, *L. monocytogenes*.

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

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

**PENGARUH PEMBERIAN VAKSINASI BCG TERHADAP JUMLAH
KUMAN HEPAR MENCIT BALB/c STRES YANG TERINFEKSI *Listeria
Monocytogenes***

Amelya Permata Sari¹⁾, 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.

Tujuan: Penelitian ini bertujuan untuk membuktikan bahwa jumlah kuman hepar mencit BALB/c yang diberi stres, terinfeksi *Listeria monocytogenes* dan mendapat vaksinasi BCG lebih rendah daripada yang tidak mendapat vaksinasi BCG.

Metode dan Bahan: Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratoris dengan pendekatan *The Post Test Only Control Group Design*. Mencit betina BALB/c sebanyak 24 ekor dibagi menjadi empat kelompok dan masing-masing mendapat pakan standar setiap hari. Kelompok Kontrol (K) tidak menerima perlakuan apa pun. Kelompok Stres (EFS) mendapatkan stres dengan *electrical foot shock* mulai hari ke-12 sampai hari ke-21. Kelompok BCG menerima injeksi 0.1cc BCG secara intraperitoneal pada hari ke-1 dan ke-11. 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 secara intravena dengan 10^4 *Listeria monocytogenes* hidup ($LD_{50} = 2 \times 10^5$ bakteri) dan pada hari ke-26 semua mencit dibunuh untuk pemeriksaan.

Hasil: Terdapat perbedaan yang bermakna dalam jumlah kuman antara kelompok EFS dan EFS+BCG ($p < 0.05$). Sementara kelompok EFS+BCG menunjukkan tidak ada perbedaan yang bermakna dengan kelompok K ($p > 0.05$).

Kesimpulan: Jumlah kuman pada hepar mencit BALB/c stres yang terinfeksi *Listeria monocytogenes* dan yang mendapat vaksinasi BCG lebih rendah bermakna daripada yang tidak mendapat vaksinasi BCG.

Kata Kunci: BCG, Stres, jumlah kuman, *L. monocytogenes*.

¹⁾ Mahasiswa Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro Semarang

²⁾ Staf Pengajar Bagian Fisika Medik Universitas Diponegoro Semarang

PENDAHULUAN

Stres dapat didefinisikan sebagai keadaan yang merupakan akibat dari uji atau ancaman terhadap kapasitas adaptif kita, sesuatu yang mengganggu keseimbangan dinamik atau homeostatik tubuh kita. Pada manusia stres dapat mempengaruhi sistem pertahanan tubuh dan meningkatkan kerentanan terhadap penyakit dan infeksi.¹ Hal yang dapat menimbulkan stres disebut sebagai stressor.² Penelitian yang dilakukan Marshall terhadap mahasiswa yang stres karena ujian (stres akademik) menunjukkan bahwa stres psikologis akan menyebabkan pergeseran keseimbangan sistem imun ke Th₂. Data menunjukkan penurunan sintesis sitokin Th₁ termasuk interferon- γ (IFN- γ), dan peningkatan sitokin Th₂ termasuk IL-10. Sehingga dipercaya bahwa stres akan menyebabkan penurunan sitokin Th₁ yang akhirnya mengacaukan respon imunitas seluler.³

BCG (bacillus Calmette-Guerin) dikenal sebagai vaksin tuberkulosis merupakan *Mycobacterium Bovis* yang dilemahkan. Sebagai bakteri intrasel yang dilemahkan, di makrofag BCG digunakan untuk memacu respon imunitas seluler dan bukan humoral.⁴ 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 mengaktivasi makrofag.⁵

Listeria monocytogenes merupakan bakteri intraseluler yang banyak digunakan sebagai model dalam mempelajari infeksi bakteri intraseluler. Pada manusia, bakteri ini menyebabkan meningo-encephalitis. 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, menstimulasi produksi antibodi dan mengopsonisasi bakteri dengan tujuan akhir membantu fungsi efektor makrofag.⁶

Bakteri ini dapat bertahan hidup di dalam makrofag dan menghindari mekanisme bakterisidal oleh makrofag, sedang makrofag yang terdapat didalam hepar yaitu sel kupfer yang dikenal sebagai sel fagosit professional akan memfagosit *Listeria Monocytogenes* yang masuk ke hepar setelah infeksi.⁷

Dengan kultur jaringan hepar maka dapat memberikan informasi mengenai respon imun tubuh yaitu melalui jumlah kuman yang masih terdapat dalam jaringan tersebut. Penurunan jumlah pada hasil hitung kuman mengindikasikan peningkatan aktifitas sistem imun pada hepar didalam melawan infeksi. Daya bunuh makrofag yang meningkat ditunjukkan dengan lebih rendahnya jumlah kuman dalam organ hepar mencit yang mendapat BCG.⁸

Penelitian ini berusaha menjawab apakah pemberian BCG dapat mencegah tingginya jumlah kuman pada hepar mencit BALB/c yang mengalami stres dan terinfeksi *Listeria monocytogenes*. Tujuan khusus penelitian ini untuk menganalisa perbedaan jumlah kuman pada hepar 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.⁹

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 satu minggu. Selama dalam pemeliharaan mencit diberi makan dan minum secara *ad libitum*. Setelah menjalani masa adaptasi, mencit kemudian dibagi

menjadi empat kelompok percobaan. Semua mencit mendapatkan makanan standar laboratoris. Pada kelompok Kontrol, mencit tidak mendapatkan perlakuan. Kelompok EFS mendapatkan stres dengan *electrical foot shock* mulai hari ke-12 sampai hari ke-21. Sementara kelompok BCG menerima injeksi 0.1cc BCG secara intraperitoneal pada hari ke-1 dan ke-11. 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. Untuk mengetahui normalitas data dilakukan uji normalitas menggunakan *Shapiro Wilk test*. Data berdistribusi normal 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*. Semua analisis statistik tersebut dilakukan dengan menggunakan program komputer SPSS 13.00 for windows.¹⁰ Nilai signifikansi pada penelitian ini adalah apabila variabel yang dianalisis memiliki nilai $p < 0.05$.

PROSEDUR PEMERIKSAAN

Hari ke-26 mencit dibunuh dengan cara dislokasi leher untuk diambil heparnya secara aseptis sebagai bahan kultur. Kultur dilakukan pada media agar darah. Penghitungan jumlah koloni dilakukan setelah media diinkubasi dalam incubator selama 24 jam pada suhu 37°C. Penghitungan kuman dilakukan dalam satuan Colony Forming Unit (CFU)/gram jaringan.

HASIL PENELITIAN

Jumlah kuman dihitung berdasarkan koloni yang tumbuh dari kultur jaringan hepar. Berikut jumlah koloni kuman jaringan hepar pada penelitian.

Tabel 1. logcfu *L. monocytogenes* hasil pengamatan kultur hepar

Kelompok	n	Rerata	SB	Minimal	Maksimal
Kontrol	6	3.86	0.57	3.02	4.48
EFS	6	4.63	0.84	3.18	5.51
BCG	6	2.91	0.66	2.35	3.95
BCG + EFS	6	3.35	0.23	3.13	3.71

One Way ANOVA → $F=8.486$; $p=0.001$

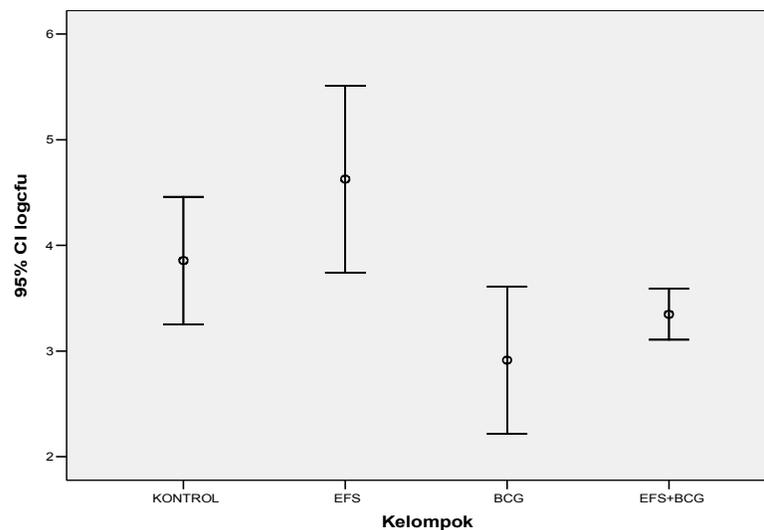
Jumlah kuman paling tinggi pada kelompok mencit yang mendapat EFS (4.63 ± 0.84) dan paling rendah pada kelompok mencit yang mendapat BCG (2.91 ± 0.66). Terdapat perbedaan yang bermakna ($p=0.001$) pada jumlah kuman antara empat kelompok percobaan.

Tabel 2. Nilai p dengan *Post Hoc Test Bonferroni*

Tes Bonferroni	Kontrol	EFS	BCG	EFS+BCG
Kontrol	-	0.261	0.095	1.000
EFS	0.261	-	0.001*	0.011*
BCG	0.095	0.001*	-	1.000
EFS+BCG	1.000	0.011*	1.000	-

* Perbedaan yang bermakna pada $p < 0.05$.

Dapat dilihat pada tabel diatas adanya perbedaan yang bermakna pada perbandingan jumlah kuman yaitu antara kelompok EFS dengan kelompok EFS+BCG ($p=0.011$) dan antara kelompok EFS dengan kelompok BCG ($p=0.001$). Tidak ada perbedaan yang bermakna antara kelompok EFS+BCG dengan kelompok Kontrol ($p=1.000$) dan antara kelompok BCG dengan kelompok EFS+BCG ($p=1.000$).



Gambar 1. Error bar logcfu masing – masing kelompok

PEMBAHASAN

Listeria monocytogenes merupakan bakteri intraseluler dan pada manusia, dapat menyebabkan meningo-encephalitis. Bakteri tersebut dapat difagositosis oleh

makrofag dan dapat menghindari mekanisme fagosom sehingga dapat bereplikasi dalam sitoplasma. Makrofag yang terdapat didalam hepar yaitu *sel kupfer* yang dikenal sebagai sel fagosit professional akan memfagosit *Listeria Monocytogenes* yang masuk ke hepar setelah infeksi.⁸

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, menstimulasi produksi antibodi dan mengopsonisasi bakteri dengan tujuan akhir membantu fungsi efektor makrofag.⁷

Pada penelitian ini didapatkan jumlah kuman pada kelompok BCG paling rendah 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 . Makrofag tersebut berhubungan dengan kemampuan daya bunuh makrofag yang ditunjukkan dengan lebih rendahnya jumlah kuman dalam organ hepar mencit yang mendapat BCG.⁸

Didukung lebih lanjut oleh penelitian Djamiatun dkk melaporkan pemberian 0,1 cc BCG produksi Biofarma dengan booster 10 hari berikutnya dengan dosis sama pada mencit BALB/c akan meningkatkan secara bermakna kemampuan fagositik dan daya bunuh makrofag limpa terhadap *Staphylococcus aureus*, disamping itu juga terjadi peningkatan produksi TNF- α dari makrofag peritoneal.¹¹

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 Type2.¹² Sehingga dalam melakukan vaksinasi adalah penting menentukan dosis tergantung respon imun mana yang akan dibangkitkan.

Hal yang sebaliknya terjadi pada kelompok EFS, pada kelompok ini didapatkan jumlah kuman yang paling tinggi. 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).¹³ 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-4.¹⁴ Ini dapat menyebabkan pergeseran fenotip T helper CD₄⁺ dari Th₁ yang berfungsi dalam imunitas seluler ke Th₂ yang melibatkan produksi antibodi.

Pada kelompok stres yang diberi BCG didapatkan jumlah kuman pada organ hepar lebih rendah dibanding kelompok yang tidak mendapat vaksinasi BCG dan ada perbedaan yang bermakna. Hal ini menunjukkan bahwa BCG dapat meningkatkan daya bunuh kuman pada mencit BALB/c, stres dapat menurunkan dan BCG dapat mencegah penurunan daya bunuh kuman pada mencit BALB/c yang mengalami stres.

Karena keterbatasan kemampuan, peneliti hanya menggunakan blood agar sebagai media kultur, yang kemungkinan masih dapat ditumbuhi oleh koloni kuman lain, sementara dengan media khusus *Listeria monocytogenes* hasil kultur dapat lebih baik. Mengingat waktu penelitian yang singkat dan sederhananya teknik yang digunakan maka peneliti hanya menggunakan hepar sebagai organ yang dikultur. Sementara infeksi *Listeria monocytogenes* dalam waktu yang lebih lama juga dapat menyebabkan meningoencephalitis, yang apabila dilakukan pemeriksaan pada otak kemungkinan hasil kulturnya dapat berbeda dibandingkan dengan hepar.

KESIMPULAN

Penelitian ini membuktikan bahwa:

1. Jumlah kuman pada hepar mencit Balb/c yang mendapat stres paling tinggi dibanding dengan kelompok yang lain.

2. Jumlah kuman pada hepar mencit Balb/c yang mendapat vaksinasi BCG paling rendah dibanding dengan kelompok yang lain.
3. Jumlah kuman pada hepar mencit BALB/c stres yang terinfeksi *Listeria monocytogenes* dan yang mendapat vaksinasi BCG lebih rendah bermakna daripada yang tidak mendapat vaksinasi BCG.

SARAN

- 1.** Diperlukan penelitian lebih lanjut tentang pengaruh vaksinasi BCG terhadap hewan coba stres yang terinfeksi *Listeria monocytogenes* melalui hitung kuman hepar dengan media khusus *Listeria monocytogenes*.
- 2.** Diperlukan penelitian lebih lanjut tentang pengaruh vaksinasi BCG terhadap hewan coba stres yang terinfeksi *Listeria monocytogenes* melalui hitung kuman pada otak dengan teknis khusus dan waktu yang lebih lama.

UCAPAN TERIMA KASIH

Syukur kepada Allah SWT sehingga artikel ini dapat diselesaikan. Penulis ingin mengucapkan terima kasih kepada:

1. Dr. Tri Nur Kristina, DMM, M. Kes, PH.D, selaku reviewer proposal
2. Dr. Dodik Pramono, selaku ketua tim penguji artikel.
3. Dr. Ratna Damma P, M.Kes, selaku dosen penguji artikel.
4. Balai Laboratorium Kesehatan Semarang.
5. Laboratorium Bioteknologi Universitas Diponegoro.
6. Bagian Biokimia Universitas Diponegoro.
7. Keluarga yang sangat mendukung baik moriil maupun materiil.
8. Teman-teman satu tim penelitian atas dukungan dan bantuannya.
9. Seluruh pihak yang telah membantu dalam pelaksanaan penelitian dan penyusunan Karya Tulis Ilmiah ini.

DAFTAR PUSTAKA

1. Baratawidjaja KG. *Imunologi dasar*. Edisi 5. Jakarta: Balai Penerbitan FKUI; 2002. p. 59-62,190-2.
2. Koehler H. Stress and immune system [Online]. 1994 [cited 2006 April 25]; Available from: URL: <http://www.econ.uiuc.edu/-harco/bio/stress.html>.
3. Russo, Marie F. Macrophages and the glucocorticoids. *J Neuroimmunol* 1992;40:281–6.
4. Slover CK, Bansal GP, Langerman S, Hanson MS. Protective immunity elicited by BCG vaccines. *Dev Biol Stand* 1994;82:163-70.
5. Joklik WK, Willet HD, Amos DB, Wilfert CM. *Zinsser microbiology*. 19th ed. New York: Prentice Hall International; 1993.
6. Abbas AK, Lichtman AH. *Cellular and molecular immunology*. 5th ed. Philadelphia: Saunders; 2003. p. 275-97.
7. Husada Y. *Fisiologi dan pemeriksaan biokimia hati*. Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia; 1996. p. 228.
8. Pudjonarko D, Susilaningsih N, Sukmaningtyas H. Pengaruh diet minyak ikan Omega-3 dan vaksinasi BCG terhadap daya bunuh Makrofag (studi eksperimental pada mencit tua BALB/c). *Media Medika Indonesiana* 2004;39(1):11-8.
9. Pratiknya AW. *Dasar-dasar metodologi penelitian kedokteran dan kesehatan*. Cetakan I. Jakarta: CV Rajawali; 1986. p. 147-65.

10. Santoso S. SPSS (Statistical Product and Service Solution). Jakarta: PT. Elex Media Komputindo; 1999. p. 300-80.
11. 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.
12. Moura AC, Werneck-Barroso E, Rosas EC, Henriques MG, Cordeiro RS. Opposite cellular accumulation and nitric oxide production in vivo after pleural immunization with *M. leprae* or *M. bovis* BCG. Int J Mol Med 1999 Jan;3(1):69-71.
13. 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. Jakarta: EGC; 1996. p. 1215-16.
14. Tjokronegoro A. Meningkatkan daya tahan tubuh dalam kehidupan sehari – hari: suatu tinjauan biologis. Seminar Sehari AG Businessman Fellowship; Jakarta: 14 Agustus 2001.

- ¹ Baratawidjaja,KG.Imunologi Dasar.Edisi5.Jakarta.Balai Penerbitan FKUI.2002:59-62,190-192
- ²Koehler,Hannah.Stress and immune system.[on line] URL: <http://www.econ.uiuc.edu/harco/bio/stress.html>.1994
- ³ 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.
- ⁴ Slover CK, Bansal GP, Langerman S, Hanson MS. Protective immunity elicited by BCG vaccines. Dev Biol Stand 1994; 82: 163-70
- ⁵ Joklik WK, Willet HD, Amos DB, Wilfert CM, Zinsser microbiology. 19th ed. New York Prentice Hall International, 1993.
- ⁶Abbas AK, Lichtman AH. Cellular and Molecular Immunology. Fifth edition. Philadelphia: Saunders, 2003. 275-97
- ⁷Husada Yast, Fisiologi dan Pemeriksaan Biokimia Hati. Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. 1996; 228.
- ⁸ Dwi Pudjonarko, Neni Susilaningsih, Hermina Sukmaningtyas. Pengaruh diet minyak ikan Omega-3 dan Vaksinasi BCG terhadap daya bunuh Makrofag (Studi Eksperimental pada Mencit Tua Balb/c). Media Medika Indonesiana 2004; 39(1): 11-8.
- ⁹ Pratiknya AW. Dasar-dasar Metodologi Penelitian kedokteran dan kesehatan. Cetakan I. Jakarta: CV Rajawali, 1986: 147-65.
- ¹⁰ Santoso S. SPSS (Statistical Product and Service Solution). Jakarta: PT. Elex Media Komputindo; 1999: 300-80.
- ¹¹ 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.
- ¹² Moura AC, Werneck-Barroso E, Rosas EC, Henriques MG, Cordeiro RS. Opposite cellular accumulation and nitric oxide production in vivo after pleural immunization with *M. leprae* or *M. bovis* BCG. Int J Mol Med 1999 Jan; 3(1): 69-71.

¹³ 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.