



**PENGARUH PEMBERIAN VAKSIN BCG TERHADAP HITUNG
JUMLAH LIMFOSIT LIEN MENCIT BALB/C YANG DIBERI
STRESOR RENJATAN LISTRIK DAN DIINFEKSI *LISTERIA*
*MONOCYTEGENES***

ARTIKEL PENELITIAN

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

Oleh

Ike Karkan

G2A 003095

**FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS DIPONEGORO
SEMARANG**

2007

LEMBAR PENGESAHAN

ARTIKEL ILMIAH

**Pengaruh Pemberian Vaksinasi BCG Terhadap Hitung Jumlah
Limfosit Lien Mencit Balb/c Yang Diberi Stresor Renjatan Listrik
Dan diinfeksi *Listeria monocytogenes***

Yang dipersiapkan dan disusun oleh :

Ilke Karkan
G2A 003095

Telah dipertahankan di depan tim penguji Karya Tulis Ilmiah Fakultas Kedokteran
Universitas Diponegoro Semarang pada tanggal 26 Juli 2007

Tim Penguji

Ketua Penguji

Penguji

(dr. Helmia Farida, M.Kes, Sp. A)
NIP. 132296247

(dr. Ratna Damma, M.Kes)
NIP. 131916037

Pembimbing

(dr. Hermina Sukmaningtyas, M.Kes)
NIP. 132205006

**THE ROLE OF BCG VACCINE TO LYMPHOCYTE COUNT IN BALB/C
MICE'S SPLEEN AGAINST ELECTRICAL FOOT SHOCK AND LISTERIA
MONOCYTOGENES**

Ilke Karkan¹⁾, Hermina Sukmaningtyas²⁾, Dwi Pudjonarko³⁾

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 emphasized on the effects of stress and combination of BCG vaccine – stress in cellular immune responses alteration through lymphocyte count in spleen.

Method and subject: This study adapts laboratory experimental and Post Test Only Control Groups Design . This particular study is designed using mice as a model.

The 24 female BALB/c (6 – 8 weeks old and average weight 21.48 ± 1.70 grams). All mice then divided into three groups and received standard lab diet daily. The first group (control group / K) received no other additional treatment. While the second group (stress group / EFS) received stressed by electrical foot shock start on day 12th until day 21st and the third group (Stress + BCG group / EFS+BCG) 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 0.1cc intravenously with 10^5 live *Listeria monocytogenes* ($LD_{50} = 2 \times 10^5$ bacteria) and terminated at day 26th. Number of lymphocyte cel per cc and spleen weight were measured. Within group difference of data were analyzed by One Way ANOVA.

Result: There are no significant differences in the lymphocyte count and spleen weight ($p > 0.05$) among groups. The lowest number of lymphocyte count was found in the EFS group. The lowest measuring of weight spleen was found in the EFS group.

Conclusion: It could be concluded that stress is immunosuppressant, while additional treatment with BCG can restore immune responses indicated by the increase of lymphocyte count in stress mice.

Key words: BCG, Stress, lymphocyte count.

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

^{2,3)} Lecturer, Medical Physic Department, Diponegoro University, Semarang

**PENGARUH PEMBERIAN VAKSINASI BCG TERHADAP HITUNG
JUMLAH LIMFOSIT LIEN MENCIT BALB/c YANG DIBERI STRESOR
RENJATAN LISTRIK**

Ilke Karkan¹⁾, Hermina Sukmaningtyas²⁾, Dwi Pudjonarko³⁾

ABSTRAK

Latar Belakang: Stres dapat menyebabkan gangguan fungsi sistem imun tubuh terutama respon imunitas seluler. Penggunaan BCG diharapkan dapat meningkatkan respon imunitas seluler tersebut.

Tujuan: Penelitian ini bertujuan untuk melihat efek penggunaan vaksinasi BCG, stres, dan kombinasi vaksinasi BCG – stres pada perubahan imunitas seluler dengan melakukan penghitungan jumlah limfosit di lien.

Metode dan Bahan: Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratoris dengan pendekatan *The Post Test Only Control Group Design*. Penelitian ini menggunakan mencit sebagai model penelitian. 18 ekor mencit betina BALB/c (umur 6 – 8 minggu dengan berat badan rata-rata 21.48 ± 1.70 gram). Mencit tersebut dibagi menjadi 3 kelompok dan masing-masing mendapat pakan standar setiap hari. Kelompok pertama (Kelompok Kontrol / K) tidak menerima perlakuan apa pun. Sementara kelompok kedua (Kelompok Stres / EFS) mendapatkan stres dengan *electrical foot shock* mulai hari ke-12 sampai hari ke-21 dan kelompok ketiga (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 monocytogenes* hidup ($LD_{50} = 2 \times 10^5$ bakteri) dan pada hari ke-26 semua mencit dibunuh untuk pemeriksaan hitung jumlah limfosit lien. Analisa perbedaan antara ketiga kelompok diuji dengan *One Way ANOVA*.

Hasil: Penelitian mendapatkan adanya perbedaan yang tidak bermakna dalam hitung jumlah limfosit dan berat lien antara kelompok perlakuan ($p > 0.05$). Jumlah limfosit lien terendah diperoleh dari kelompok EFS/stres. Jumlah berat lien terendah didapatkan pada kelompok EFS/stres.

Kesimpulan: Didapatkan bahwa stres menekan sistem imun, sementara pemberian BCG dapat memperbaiki respon imunitas tersebut melalui peningkatan jumlah limfosit lien pada mencit stres.

Kata Kunci: BCG, Stres, Hitung jumlah limfosit.

¹⁾ Mahasiswa Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro Semarang

^{2,3)} Staf Pengajar Bagian Fisika Medik Universitas Diponegoro Semarang

PENDAHULUAN

Pada manusia, stres dapat mempengaruhi sistem imun dan meningkatkan kerentanan terhadap penyakit dan infeksi. Nampaknya kortisol yang merupakan hormon stres berperan dalam efek negatif tersebut. Kortisol menunjukkan efek terhadap imunitas nonspesifik dan spesifik, mencegah banyak aspek fungsi makrofag, mencegah aktivitas presentasi antigen dan mencegah fungsi sel limfosit T. Kadar kortisol yang tinggi dapat menurunkan jumlah limfosit T sehingga terjadi *immunocompromise*.¹

Banyak imunopotensiator yang diperkenalkan dapat menambah reaktivitas imunologis. Salah satu imunopotensiator tersebut adalah *Mycobacterium Bovis* yang dilemahkan yaitu strain Bacillus Calmette-Guerin (BCG).^{2,3} 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.⁴ Penggunaan dosis BCG yang tepat akan menginduksi respon imunitas seluler. Pemberian vaksin BCG dilaporkan dapat meningkatkan jumlah limfosit T. Secara invitro BCG akan meningkatkan limfosit yang terbukti dengan didapatinya dalam jumlah banyak limfoblas di lien.⁵

Lien merupakan tempat respon imun utama terhadap mikroorganisme yang beredar dalam sirkulasi. Lien merupakan tempat produksi limfosit, produksi antibodi, dan pemindahan antigen darah. Limfosit T berasal dari sel timus yang disebarkan darah ke seluruh tubuh dan menempati limfonodus, lien, dan berbagai kumpulan limfoid di jaringan. Limfosit T dapat menjalankan respon imunologiknya jika disensitisasi dengan membentuk banyak sekali limfosit turunan, berkontak, menyerang, dan menghancurkan bakteri intraseluler seperti *Listeria monocytogenes*.

Bakteri ini banyak digunakan sebagai model dalam mempelajari infeksi bakteri intraseluler.⁶

Listeria monocytogenes yang masuk ke lien dapat bertahan hidup di dalam makrofag lien dan menghindari mekanisme bakterisidal oleh makrofag. Mekanisme imun yang berperan untuk melawan *Listeria monocytogenes* adalah *T cell-mediated immunity*.⁶ Kunci utama mekanisme ini adalah limfosit T yang tersensitisasi dan makrofag yang teraktivasi.

Penelitian ini berusaha menjawab apakah pemberian BCG dapat mencegah penurunan jumlah limfosit T mencit yang tertekan karena stres. Tujuan penelitian ini untuk menganalisis perbedaan jumlah limfosit 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

A. Rancangan penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorik, dengan pendekatan *The Post Test – Only Control Group Design* yang menggunakan binatang percobaan sebagai objek penelitian. Percobaan dilakukan dengan rancangan acak lengkap (*Completely Randomized Design*), randomisasi sederhana dilakukan menggunakan komputer. Perlakuan adalah pemberian sensasi nyeri menggunakan *electric foot shock* pada mencit dan pemberian vaksinasi BCG dengan keluaran

(outcome) adalah perubahan imunitas seluler yang dinilai dari hitung Jumlah sel limfosit lien dan berat lien.

B. Populasi

Populasi penelitian ini adalah mencit betina strain BALB/c berusia 6-8 minggu. Strain mencit yang dipilih adalah BALB/c sebab mencit strain BALB/c yang berumur antara 6 minggu sampai 12 minggu telah dilaporkan dapat menimbulkan respon imunitas seluler apabila mencit tersebut diinokulasi dengan *Listeria monocytogenes* hidup.⁷ Bakteri diberikan pada hari ke-21 karena pada saat itu modulasi sistem imun dari BCG dan stresor renjatan listrik telah dilakukan

C. Sampel

Sampel dalam penelitian ini adalah mencit. Untuk menghindari bias dalam penelitian maka dilakukan kontrol sebagai berikut: mencit Balb/c, usia 6-8 minggu, betina, berat rata-rat 25 gram. Sebelum digunakan dalam penelitian, 18 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 maka dilakukan penimbangan mencit sebelum mendapat perlakuan. Selanjutnya mencit dibagi menjadi 3 kelompok secara acak, masing-masing terdiri dari 6 ekor yaitu:

K = Kontrol, sebagai pembanding mencit tidak mendapatkan perlakuan apapun kemudian diinokulasi 10^4 *Listeria monocytogenes* → Kelompok Kontrol (K)

EFS = Mencit mendapatkan sensasi nyeri menggunakan *electric foot shock* kemudian diinokulasi 10^4 *Listeria monocytogenes* → Kelompok stres

EFS+BCG = Mencit mendapatkan sensasi nyeri menggunakan *electric foot shock* dan diberi vaksin BCG kemudian diinokulasi 10^4 *Listeria monocytogenes* → Kelompok stres + BCG

D. Electric foot shock

Pemilihan stresor berupa renjatan listrik pada alas kaki dengan *electric foot shock* karena intensitas dapat terukur dengan tepat, penjalaran arus listrik dari kaki ke seluruh tubuh termasuk ke otak berjalan cepat dan pemulihan setelah renjatan tidak ada efek ikutan. Banyak penelitian telah dilakukan dengan renjatan listrik sebagai stresor untuk menimbulkan stres dan memberi dampak pada target spesifik, telah terbukti dan menunjukkan akurasi yang tepat. Sedangkan pemilihan lama waktu 10 hari adalah berdasarkan penelitian terdahulu bahwa kadar kortisol mulai meningkat pada hari ke-4, mencapai puncak pada hari ke-7 dan mulai menurun pada hari ke-14. Sehingga dapat diharapkan pada hari ke-10 sudah terjadi modulasi sistem imun.⁷

Electric foot shock dilakukan dengan cara mengalirkan arus listrik pada lempeng tembaga di dasar kandang perlakuan tempat kaki mencit berpijak. Aliran listrik akan mengejutkan mencit. Besar arus listrik antara 1 – 3mA. Jumlah renjatan adalah sebagai berikut:

Hari ke-	Reinjatan	sesi
12	4	2
13	8	2
14	10	3
15	12	3
16	14	4
17	16	4
18	18	5
19	20	5
20	22	6
21	24	6

Lama 1 kali renjatan = 1 kejut, diberikan interval 4 menit untuk tiap sesi. Hari pertama diberikan 4 reinjatan-2 sesi, hari kedua diberikan 8 reinjatan-2 sesi bukannya 6 reinjatan-2sesi, karena peningkatan sebanyak 2 reinjatan x 2 sesi untuk hari kedua dianggap terlalu kecil.

E. Vaksin BCG

Yang dimaksud vaksin BCG adalah 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.

Pemberian BCG pada penelitian ini hanya merupakan salah satu pemberian imunomodulator yang telah banyak diteliti. Dalam penelitian selanjutnya bisa diberikan jenis imunomodulator lain yang saat banyak ditawarkan di pasaran.

F. Hitung jumlah limfosit

Vaksinasi BCG tidak hanya memacu respon imun yang diperantarai sel T saja tetapi juga meningkatkan kemampuan sel T dalam bereaksi terhadap antigen BCG dengan meningkatkan jumlah limfosit. Secara invitro BCG akan meningkatkan limfosit T CD4+ yang terbukti dengan didapatinya dalam jumlah banyak sel-sel blast CD4+ dalam kultur.⁵ Puncak proliferasi limfosit terjadi 2 minggu setelah vaksinasi.² Pengambilan sampel pada hari ke-25 dianggap telah terjadi peningkatan jumlah limfosit hasil dari proliferasi dan maturasi limfoblas menjadi limfosit. Pemeriksaan hitung jumlah limfosit menggunakan bilik hitung neubauer improve.

G. Pengolahan data.

Data hasil penelitian diolah dan disajikan dalam bentuk tabel dan grafik. Data dari ketiga 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 15.00 for windows*. Nilai bermakna pada penelitian ini apabila variabel yang dianalisis memiliki nilai $p < 0,05$.

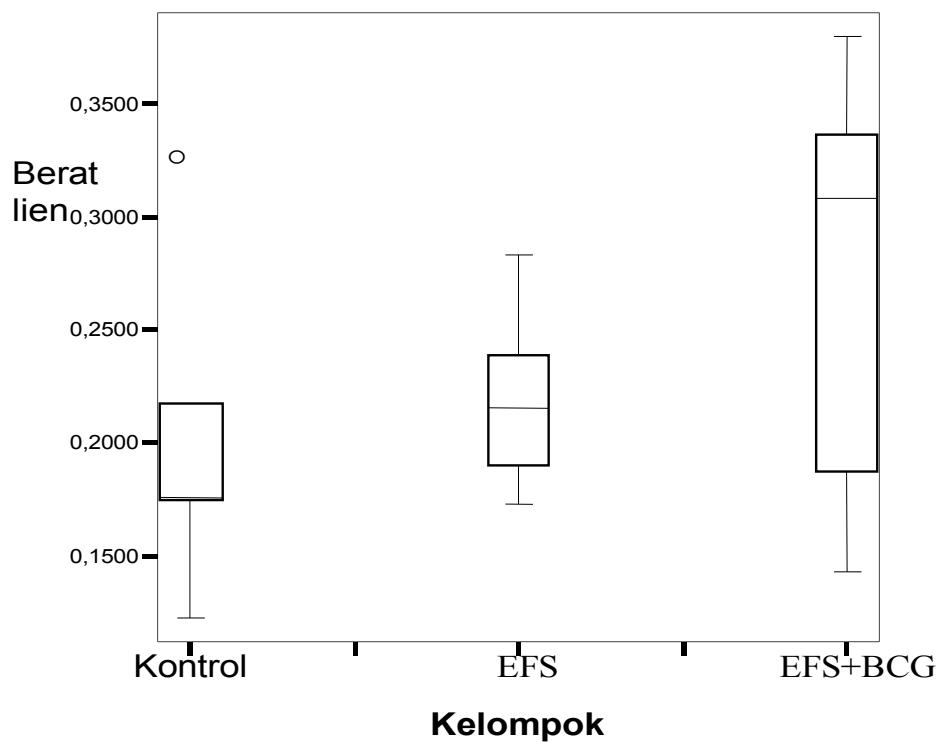
HASIL PENELITIAN

Dari pengukuran berat lien menggunakan timbangan elektronik diperoleh rerata berat lien tiap kelompok yang dapat dilihat pada tabel 1 dan gambar 1. Rerata

berat lien pada mencit stres yang mendapat vaksinasi BCG lebih tinggi dari yang tidak mendapat vaksin BCG, walaupun perbedaan itu tidak signifikan ($p=0,17$).

Tabel 1. Berat Lien dalam gram

Kelompok	N	Rerata	Standar Deviasi	Maksimum	Minimum
Kontrol	6	0,19	0,07	0,33	0,12
EFS	6	0,21	0,04	0,28	0,17
BCG+EFS	6	0,28	0,09	0,38	0,14



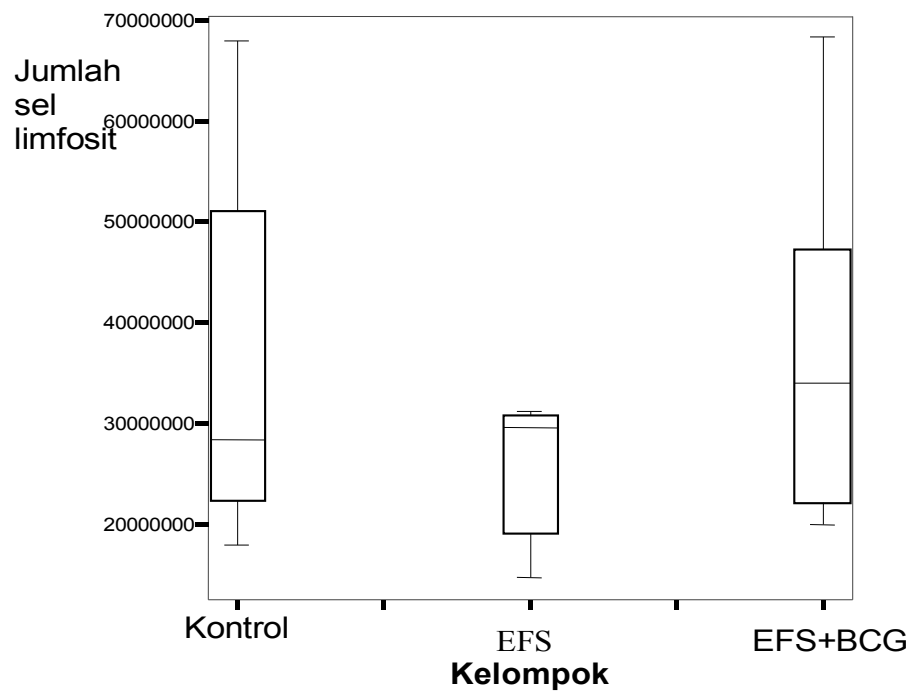
Gambar 1. Grafik distribusi varians berat lien dalam gram

Sedangkan penghitungan jumlah limfosit lien menggunakan bilik hitung neubauer improve diperoleh rerata berat lien tiap kelompok mencit yang dapat dilihat pada tabel 2 dan gambar 2. Rerata jumlah limfosit pada mencit stres yang mendapat

vaksin BCG lebih tinggi dari yang tidak mendapat vaksin BCG, walaupun perbedaan itu tidak signifikan ($p=0,21$)

Tabel 2. Jumlah sel limfosit per cc

Kelompok	N	Rerata	Standar Deviasi	Maksimum	Minimum
Kontrol	6	$3,60 \times 10^7$	$1,94 \times 10^7$	$6,80 \times 10^7$	$1,79 \times 10^7$
EFS	6	$2,58 \times 10^7$	$7,07 \times 10^7$	$3,120 \times 10^7$	$1,47 \times 10^7$
BCG+EFS	6	$3,75 \times 10^7$	$1,94 \times 10^7$	$6,832 \times 10^7$	$1,98 \times 10^7$



Gambar 2. Grafik distribusi varians jumlah limfosit per cc

PEMBAHASAN

Pemberian stressor, melalui HPA aksis akan meningkatkan sekresi kortisol yang menghambat sintesis MHC II dan CD4+.⁶ Selain itu stress melalui SAM aksis akan meningkatkan katekolamin yang dapat menekan sintesis IL-12 dan

meningkatkan produksi IL-10.⁹ Kedua mekanisme tersebut secara sinergis dapat menurunkan imunitas seluler yang akhirnya dapat menurunkan jumlah limfosit.^{8,9} Vaksin BCG seperti dijelaskan sebelumnya, digunakan untuk melawan penurunan imunitas seluler yang diakibatkan oleh stres.

Dari hasil penelitian ini diketahui ada perbedaan yang tidak bermakna dari jumlah limfosit lien, berat lien, dan perubahan berat lien pada mencit yang diberi stressor, diinfeksi *L. monocytogenes* dan diberi vaksin BCG dengan yang tidak diberi vaksin BCG. Faktor-faktor yang menyebabkan hasil tidak bermakna akan dibahas satu per satu dalam bab ini.

1. Hitung jumlah limfosit.

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 melalui sistem fagositosis. Proses fagositosis diikuti dengan proses pembunuhan kuman (*killing*). Tetapi bakteri intraseluler ini dapat luput dari pencernaan makrofag karena resisten terhadap enzim-enzim lisosom fagosit pada makrofag. Selain itu bakteri ini juga dapat menghindari mekanisme penghancuran tersebut dengan cara melubangi makrofag dan kemudian keluar dari endosom.¹⁰

Pada kondisi tersebut hanya makrofag yang teraktivasi yang dapat membunuh bakteri ini. Selain itu bakteri juga dapat dibunuh oleh limfosit yang teraktivasi lewat presentasi antigen oleh makrofag. Kontribusi sel T CD₄⁺ ditandai dengan sekresi sitokin yang memacu aktivasi makrofag oleh interferon- γ , memacu sekresi TNF α yang mengaktifkan inflamasi, dan mendorong maturasi dan peningkatan jumlah limfosit.¹¹ Keadaan *immunocompromise* akibat stres dapat menghambat fungsi dan menurunkan jumlah limfosit T CD₄⁺.¹

Hasil penelitian ini menggambarkan adanya hubungan antara pemberian vaksin BCG dalam mencegah penurunan limfosit T CD4+ mencit akibat stres. Kondisi ini dikarenakan karena penggunaan dosis BCG yang tepat akan menginduksi respon imunitas seluler melalui respon Type1.¹² Penelitian kami sebelumnya membuktikan bahwa pemberian BCG akan meningkatkan kemampuan proliferasi limfosit secara bermakna.⁵ Vaksinasi BCG tidak hanya memacu respon imun yang diperantarai sel T saja tetapi juga meningkatkan kemampuan sel T dalam bereaksi terhadap antigen BCG dengan meningkatkan jumlah limfosit. Secara invitro BCG akan meningkatkan limfosit T CD4+ yang terbukti dengan didapatinya dalam jumlah banyak sel-sel blast CD4+ dalam kultur.⁵ Puncak proliferasi limfosit terjadi 2 minggu setelah vaksinasi.⁵ Karena penelitian ini menggunakan waktu lebih dari 2 minggu maka telah terjadi maturasi limfoblas menjadi limfosit.

Kemungkinan penyebab penelitian kurang bermakna adalah karena mekanisme imun yang paling berperan adalah makrofag yang teraktivasi oleh interferon gamma, yang merupakan sitokin dari T helper. Selain itu, dikarenakan pajanan antigen yang diberikan pada mencit merupakan infeksi primer maka klon limfosit yang terjadi lebih lambat, potensinya lemah, dan masa hidupnya singkat.¹³ Penelitian yang lain melaporkan bahwa BCG juga dapat meningkatkan daya bunuh kuman oleh makrofag melalui peningkatan NO. NO dan produk-produk reaktifnya dengan radikal oksigen peroksinitrit memegang peranan untuk membunuh bakteri intraseluler pada makrofag alveolar manusia.¹⁴ Tingginya produksi NO makrofag tersebut berhubungan dengan daya bunuh makrofag yang ditunjukkan dengan lebih rendahnya jumlah kuman dalam organ hepar mencit

yang mendapat BCG.⁵ Selain itu pada lien dapat terjadi penurunan jumlah kuman sehingga proses klon limfosit ikut berkurang.

Oleh sebab itu perlu dilakukan penghitungan jumlah kuman di lien untuk membuktikan adanya peningkatan daya bunuh kuman oleh makrofag sebelum terjadi proliferasi dan maturasi limfosit.

Dari hasil statistik nilai rata-rata dari kombinasi pemberian vaksin BCG pada mencit stres lebih tinggi dari yang tidak mendapat vaksin BCG. Hal yang menyebabkan penelitian ini kurang bermakna disebabkan oleh adanya data-data yang ekstrim sehingga mengganggu perolehan hasil statistik. Untuk mengatasi hal ini seharusnya nilai-nilai yang ekstrim tersebut dikeluarkan. Tetapi karena sampel tidak memenuhi untuk keadaan diatas maka hal ini tidak bisa dilakukan.

2. Berat lien.

Dari uji Korelasi pearson diperoleh bawa tidak ada korelasi antara berat lien dengan hitung jumlah limfosit. Antara berat lien dengan jumlah limfosit juga tidak diperoleh korelasi sehingga hasil belum dapat disimpulkan. Berat lien dipengaruhi oleh banyak faktor yang dipengaruhi oleh berat badan, inflamasi, transudat cairan, dan lain-lain.

SIMPULAN

Vaksinasi BCG dapat mencegah penurunan jumlah limfosit lien mencit Balb/c stres. Didapatkan perbedaan yang tidak bermakna jumlah limfosit lien mencit stres yang divaksinasi BCG dibanding yang tidak ($p=0,42$). Stres menekan jumlah limfosit CD4+ dan penggunaan BCG dapat mencegah atau meminimalkan efek tersebut dengan memperbaiki aktivitas respon seluler melalui peningkatan jumlah limfosit CD4+.

SARAN

Melakukan penghitungan jumlah limfoblas sebagai parameter awal proliferasi limfosit.

UCAPAN TERIMAKASIH

Pada kesempatan ini penulis ingin mengucapkan terimakasih kepada dosen pembimbing dan konsultan. 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 atas terlaksananya penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

1. Karnen Garna Brata Wijaya. *Imunologi dasar*. Ed 6. Fakultas Kedokteran Indonesia. 2004: 261-269.
2. Slover CK, Bansal GP, Langerman S, Hanson MS. Protective immunity elicited by rBCG vaccines. *Dev Biol Stand* 1994; 82: 163-70
3. Shanahan JF, Bayley and Scott's *Diagnostic Microbiology*. 9th ed. Missouri: Mosby Year – book, 1994: 321 – 30
4. *Ensiklopedia Nasional Indonesia*. Jilid 15. PT. Cipta Adi Pustaka. Jakarta:191.260-261.
5. 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.
6. Ryan JL. Bacterial disease. In : Stites DP, Terr AI, Parslow TG, editors. *Basic clical Immunology*. 8th ed. Connecticut : Appleton & Lange, 1994
7. Ziegler K, Unanue ER. Identification of macrophage antigen processing event required for Ia region restricted antigen presentation to T lymphocytes. *J Immunol* 1981; 127: 1865-75.
8. Padgett DA, Glaser R. How Stress influences the immune response. *TRENDS in immunology* August 2003; 24(8): 444-8
9. Madden KS and Livnat S. Catecholamine action and immunologic reactivity. In: Ader R editor. *Psychoneuroimmunology*, 2nd ed. Academic Press,1991.
10. Jawetz E, Melnik JL, Adelberg EA, Brooks JF, Butel JS, Ornston LN. *Medical Microbiology*. 19th ed. Connecticut : Appleton & Lange, 1991.

11. Emoto M, Emoto Y, Buchwalow IB, Kauffmann SH. Induction of IFN-gamma-producing CD4⁺ natural killer T cells by Mycobacterium bovis Bacillus Calmette Guerin. *Eur J Immunol* 1999 Feb; 29(2): 650-9.
12. 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 bacille Calmette-Guerin in IL-12 deficient mice. *J Immunol* 1998 Jun 15; 160(12): 6101-11.
13. Kasper, Braunwald, Fauci, Hauserr, Longgo, Jameson. *Harrison's principles of internal medicine*. The McGraw-HillCompanies, Inc. USA. 2005.
14. Nozaki Y, Hasegawa Y, Ichiyama S, Nakashima I, Shimokata K. Mechanism on nitric oxide-dependent killing of Mycobacterium bovis BCG in human alveolar macrophages. *Infect Immun* 1997 Sep; 65(9): 3644-7.