



PENGARUH PEMBERIAN MINYAK JINTAN HITAM (*Nigella sativa*) DOSIS BERTINGKAT TERHADAP PARASITEMIA MENCIT BALB-C YANG DIINFEKSI PLASMODIUM BERGHEI

THE EFFECT OF GRADUAL DOSES OF NIGELLA SATIVA OIL ON PARASITEMIAS IN THE PLASMODIUM BERGHEI INFECTED BALB-C MICE

ARTIKEL KARYA TULIS ILMIAH

**Disusun untuk memenuhi sebagian persyaratan
guna mencapai derajat sarjana strata-1 kedokteran umum**

**DIAJENG ANNISA HAPSARI
G2A 007 060**

**PROGRAM PENDIDIKAN SARJANA KEDOKTERAN
FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS DIPONEGORO
TAHUN 2011**

**PENGARUH PEMBERIAN MINYAK JINTAN HITAM (*Nigella sativa*)
DOSIS BERTINGKAT TERHADAP PARASITEMIA MENCIT BALB-C
YANG DIINFEKSI PLASMODIUM BERGHEI**

Diajeng Annisa Hapsari¹, Edi Dharmana²

ABSTRAK

Latar Belakang : *Nigella sativa* merupakan salah satu tanaman tradisional yang berkhasiat mengobati berbagai macam penyakit, termasuk penyakit parasit. Malaria adalah suatu penyakit tropis yang disebabkan oleh parasit protozoa dari genus Plasmodium. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh pemberian minyak *Nigella sativa* terhadap parasitemia pada mencit yang diinfeksi *Plasmodium berghei*.

Metode : Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorium. Metode yang digunakan adalah *The 4-day Suppressive Test* yaitu dengan cara memberikan perlakuan mulai hari ke-0 sampai hari ke-3. Populasi penelitian adalah mencit *Balb-c*, sampel dipilih secara *simple random sampling* dibagi menjadi 4 kelompok dimana tiap kelompok terdapat 5 ekor mencit. Pada penelitian ini 1 kelompok sebagai kontrol hanya diberi aquades dan 3 kelompok perlakuan yang diberi minyak *Nigella sativa* dengan variasi dosis 50 µl/kg; 100 µl/kg; 200 µl/kg. Setiap hari mulai hari ke-1 sampai hari ke-4 dilakukan pengambilan darah tepi untuk menghitung parasit yang diamati dari preparat darah hapus dan menentukan *effective dose-50* (ED-50) berdasarkan prosentase penghambatan pertumbuhan parasit pada hari ke-4.

Hasil : Analisis probit didapatkan nilai ED-50 terletak pada dosis 33,157 µl/kg. Berdasarkan grafik prosentase efek dan log dosis, diperoleh persamaan probit yaitu: $y = 0,4784x - 0,0865$; $R^2 = 0,915$, berarti memiliki hubungan sangat kuat. Prosentase efek dari masing- masing dosis adalah kelompok perlakuan 1 sebesar 0,701%, kelompok perlakuan 2 sebesar 0,921%, dan kelompok perlakuan 3 sebesar 0,989%.

Simpulan : Pemberian minyak *Nigella sativa* dapat menurunkan parasitemia dibandingkan kelompok kontrol. Analisis probit didapatkan nilai ED-50 terletak pada dosis 33,157 µl/kg.

Kata kunci : *Nigella sativa*, parasitemia, aktivitas antimalaria

¹Mahasiswa program pendidikan S-1 kedokteran umum FK Undip

²Staf pengajar Bagian Parasitologi FK Undip, Jl. Dr. Sutomo No. 18 Semarang

THE EFFECT OF GRADUAL DOSES OF NIGELLA SATIVA OIL ON PARASITEMIAS IN THE PLASMODIUM BERGHEI INFECTED BALB-C MICE

Diajeng Annisa Hapsari¹, Edi Dharmana²

ABSTRACT

Background: *Nigella sativa* is one of the traditional plants for the treatment of a variety of sicknesses including parasitic diseases. Malaria is a tropical disease caused by protozoan parasites of the genus *Plasmodium*. This study aimed to analyze the effect of *Nigella sativa* oil on parasitemias in the *Plasmodium berghei* infected Balb-c mice.

Methods: This was a laboratory experimental research. The method used was The 4-day Suppressive Test which was given intervention from the zero day until the third day. Study population was Balb-c mice, sample was divided into 4 groups with simple random sampling with 5 mice each group. In this study, one group was given only distilled water as control and 3 treatment groups fed with various dosage of *Nigella sativa* oil 50 μ l/kg; 100 μ l/kg; 200 μ l/kg. Everyday from the first day until the fourth day, parasitemias were determined and counted ED-50.

Result: Probit Analyse for counting ED-50, showed that ED-50 is dose 33,157 μ l/kg. Based on log dose-effect curve, probit equation on chart are $y = 0,4784x - 0,0865$; $R^2 = 0,915$, meaning have a strong relationship between x and y . Percentage of effect from each dose were $P1 = 0,701\%$, $P2 = 0,921\%$, and $P3$ were $0,989\%$.

Conclusion: *Nigella sativa* oil administration is able to decrease the parasitemias compared to control group. Based on probit analyse, that ED-50 is dose 33,157 μ l/kg.

Keywords: *Nigella sativa*, parasitemias, antimalarial activity

¹ A student education program S-1 general medical of Medical Faculty Diponegoro University

² Lecturer of Parasitology Medical Faculty Diponegoro University, Jl. Dr. Sutomo No. 18 Semarang

PENDAHULUAN

Malaria masih merupakan masalah kesehatan di lebih dari 100 negara atau 41% penduduk dunia, penyebarannya sangat luas dan menjadi endemis di daerah tropis dan sub tropis. Kasus malaria setiap tahunnya berjumlah 350-500 juta dan mengakibatkan 1,5-2,7 juta kematian, terutama terjadi pada anak-anak dan ibu hamil. ¹

Suatu masalah penting yang mempersulit penanggulangan malaria adalah berkembangnya resistensi terhadap klorokuin khususnya *Plasmodium falciparum* di sebagian besar wilayah endemik malaria. Resistensi *Plasmodium vivax* terhadap klorokuin juga telah dilaporkan di Papua New Guinea, Irian Jaya, Pulau Nias dan beberapa daerah lainnya. Resistensi terhadap sulfodoksin atau pirimetamin dan meflokuin juga telah ditemukan di beberapa daerah Asia Tenggara dan Amerika Selatan. ²

Keadaan ini menyebabkan meningkatnya pemakaian obat-obat tradisional. Khasiat sebagian obat-obat tradisional ini belum dibuktikan secara ilmiah, maka penelitian ilmiah ini menjadi prioritas dalam upaya peningkatan mutu dan keamanannya. Salah satu tanaman yang digunakan untuk pengobatan tradisional adalah *Nigella sativa* (*N. sativa*). ³ Penelitian sebelumnya telah membuktikan berbagai efek *Nigella sativa* sebagai imunomodulator, antara lain dapat merangsang peningkatan TNF- α dan IL-6, dan produksi VEGF oleh sel monosit. ⁴ Pelepasan TNF- α dan IL-6 ini merupakan bagian dari imunitas malaria didapat nonspesifik terhadap sporozoit yang masuk darah. ⁵

Pengujian *in vitro* aktivitas antiplasmodial *Nigella sativa* sudah pernah diteliti sebelumnya, penelitian tersebut menyatakan bahwa *Nigella sativa* terbukti 100% menghambat pertumbuhan parasit malaria.⁶ Pengujian *in vivo* *Nigella sativa* sebagai antimalaria juga sudah pernah dilakukan sebelumnya.⁷ Akan tetapi pada metode analisis tidak menggunakan metode standar untuk uji ekstrak, penelitian tersebut hanya mencari uji beda antar kelompok. Pengujian keefektifan suatu bahan tradisional secara *in vivo* seharusnya dengan analisis probit untuk menghitung ED-50 bukan mencari uji beda antar kelompok perlakuan. Oleh karena itu, peneliti tertarik untuk meneliti pengaruh pemberian minyak *Nigella sativa* terhadap parasitemia mencit *Balb-c* yang diinfeksi *Plasmodium berghei*.

METODE

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorium, dengan pendekatan *The Post Test-Only Control Group Design* yaitu dengan cara membandingkan hasil observasi pada kelompok kontrol dan perlakuan setelah diberi tindakan. Penelitian ini menggunakan metode *The 4-day Suppressive Test* yaitu dengan cara memberikan perlakuan mulai dari hari ke-0 sampai hari ke-3. Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Mei sampai Juli 2011 meliputi bidang parasitologi dan farmakologi. Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada Yogyakarta.

Besar sampel penelitian sesuai dengan kriteria WHO (1993) yaitu minimal menggunakan 5 ekor tikus tiap 1 kelompok perlakuan sehingga

besar sampel total yang digunakan adalah 20 ekor mencit betina. Kriteria inklusi sampel dalam penelitian adalah *Balb-c* kelamin betina, umur 8 minggu, dengan berat badan 25 gram, dalam keadaan sehat tanpa abnormalitas anatomi yang tampak, serta aktivitas dan tingkah laku normal. Kriteria eksklusi dari penelitian ini adalah mencit *Balb-c* mati sebelum dilakukan observasi dan terdapat abnormalitas anatomis secara makroskopis. Pemilihan sampel dilakukan secara *simple random sampling* di mana semua objek populasi mempunyai kesempatan yang sama sebagai sampel.

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah pemberian minyak *Nigella sativa* dengan variasi dosis 50 $\mu\text{l/kg}$; 100 $\mu\text{l/kg}$; dan 200 $\mu\text{l/kg}$, skala numerik. Variabel tergantung penelitian ini adalah prosentase parasitemia mencit *Balb-c*, skala numerik. Minyak *Nigella sativa* adalah minyak yang berasal dari biji *Nigella sativa*, yang diekstraksi dengan pelarut etanol dengan menggunakan metode sokletasi diberikan per oral dalam bentuk cairan sejumlah 0,2 ml untuk setiap mencit. Prosentase parasitemia adalah prosentase jumlah eritrosit yang terinfeksi parasit per jumlah total eritrosit (\pm 1000 eritrosit) melalui penghitungan di bawah mikroskop dengan perbesaran 1000x. Effective Dose-50 (ED-50) adalah dosis yang menghasilkan efek yang dikehendaki pada 50 persen populasi. Cara menghitung prosentase penghambatan pertumbuhan parasit pada hari ke-4 pada setiap mencit adalah:

Data yang dikumpulkan dalam penelitian ini adalah data primer hasil penelitian yaitu prosentase parasitemia pada kelompok kontrol dan kelompok perlakuan kemudian dihitung ED-50 berdasarkan prosentase penghambatan pertumbuhan parasit pada hari ke-4.

Mencit *Balb-c* betina sebanyak 20 ekor diadaptasikan selama 7 hari, diberi pakan standar dan minum. Setelah diadaptasikan, mencit- mencit dibagi menjadi 4 kelompok (1 kelompok kontrol dan 3 kelompok perlakuan) secara random menjadi 5 ekor tiap kelompok dan dikandangkan per kelompok.

Mencit pada kelompok kontrol diinfeksi 2% *P.berghei* parenteral pada hari ke-0, diberikan diet standar tanpa pemberian minyak *Nigella sativa*. Mencit pada kelompok perlakuan terdapat 3 kelompok dengan variasi dosis 50 $\mu\text{l/kg}$; 100 $\mu\text{l/kg}$; dan 200 $\mu\text{l/kg}$. Mencit diinfeksi 2% *P.berghei* parenteral pada hari ke-0, diberikan diet standar kemudian pada 2-4 jam post infeksi ditambah pemberian minyak *Nigella sativa* secara oral per hari sampai hari ke-3. Setiap hari mulai dari hari ke-1 sampai hari ke-4 dilakukan pengambilan darah tepi melalui ekor mencit untuk menghitung prosentase parasitemia yang diamati dari preparat darah hapus. Kemudian menentukan *effective dose-50* (ED-50) berdasarkan prosentase penghambatan pertumbuhan parasit pada hari ke-4.

Data yang diperoleh kemudian diolah dengan program komputer *SPSS 15.0 for Windows*. Data tersebut kemudian diolah menggunakan

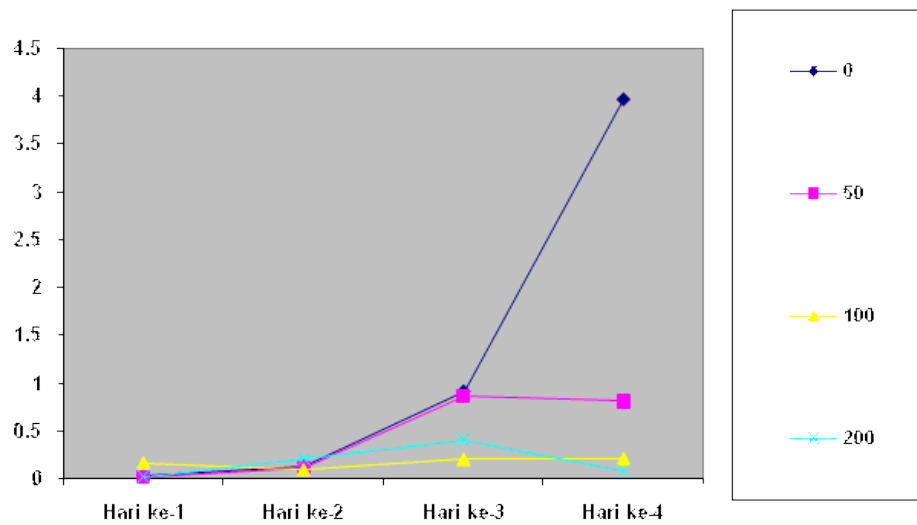
Analisis Probit untuk menghitung nilai ED-50 dengan indikator prosentase penghambatan pertumbuhan parasit yang dicari berdasarkan data prosentase parasitemia pada hari ke-4.

HASIL

Dengan mengamati preparat penelitian, kemudian didapatkan data sebagai berikut:

Tabel 1 Tabel rerata hasil prosentase parasitemia

Sampel	Hari ke-1	Hari ke-2	Hari ke-3	Hari ke-4
Kontrol	0,034	0,134	0,912	3,962
Perlakuan 1	0,014	0,112	0,864	0,812
Perlakuan 2	0,16	0,088	0,2	0,204
Perlakuan 3	0,018	0,204	0,402	0,08



Gambar 1 Grafik prosentase parasitemia per hari

Gambar grafik prosentase di atas terlihat bahwa pada kelompok kontrol terjadi peningkatan prosentase parasitemia yang mencolok dari hari ke-1 sampai hari ke-4, kelompok dosis 50 terjadi peningkatan prosentase parasitemia sampai hari ke-3 kemudian sedikit penurunan prosentase parasitemia pada hari ke-4, kelompok dosis 100 terjadi penurunan prosentase parasitemia sampai hari ke-2 kemudian terjadi sedikit peningkatan prosentase parasitemia sampai hari ke-4, sedangkan pada kelompok dosis 200 terjadi peningkatan prosentase parasitemia sampai hari ke-3 kemudian terjadi penurunan prosentase parasitemia pada hari ke-4.

Selanjutnya menentukan ED-50 dengan cara menghitung prosentase penghambatan pertumbuhan parasit pada hari ke-4 pada setiap mencit.

Tabel 2 Tabel hasil prosentase penghambatan pertumbuhan parasit pada hari ke-4

Mencit	Sampel	% Parasitemia	% Hambatan Pertumbuhan
1	Kontrol	5	0
	Perlakuan 1	0,92	81,6
	Perlakuan 2	0,52	89,6
	Perlakuan 3	0,24	95,2
2	Kontrol	3,5	0
	Perlakuan 1	0,53	84,9
	Perlakuan 2	0,15	95,7
	Perlakuan 3	0,09	97,4
3	Kontrol	6,34	0
	Perlakuan 1	0,95	79,6
	Perlakuan 2	0,2	96,8
	Perlakuan 3	0,07	98,9
4	Kontrol	3,82	0
	Perlakuan 1	0,78	75,6
	Perlakuan 2	0	100
	Perlakuan 3	0	100
5	Kontrol	1,15	0

	Perlakuan 1	0,88	23,5
	Perlakuan 2	0,15	86,9
	Perlakuan 3	0	100
Rata-rata		1,2645	65,285

Tabel 3 Tabel rerata prosentase penghambatan pertumbuhan parasit pada hari ke-4

Sampel	Rerata Prosentase Penghambatan
Kontrol	0
Perlakuan 1	69,04
Perlakuan 2	93,8
Perlakuan 3	98,3

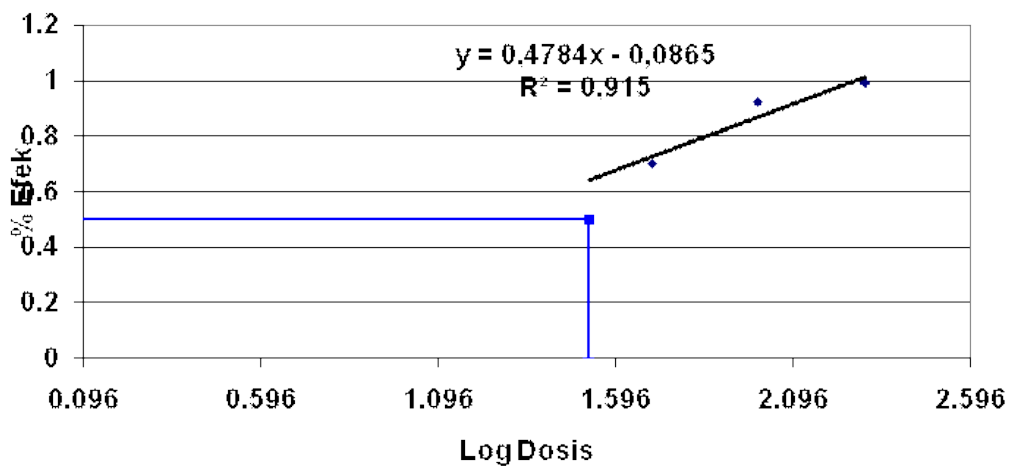
Tabel 4 Tabel hasil analisis probit

Confidence Limits

Probability	95% Confidence Limits for Dose			95% Confidence Limits for log(Dose) ^a		
	Estimate	Lower Bound	Upper Bound	Estimate	Lower Bound	Upper Bound
PROBIT .010	5.392	1.340	10.610	.732	.127	1.026
.020	6.671	1.858	12.437	.824	.269	1.095
.030	7.636	2.285	13.757	.883	.359	1.139
.040	8.452	2.670	14.843	.927	.426	1.172
.050	9.180	3.030	15.790	.963	.481	1.198
.060	9.849	3.374	16.645	.993	.528	1.221
.070	10.475	3.708	17.432	1.020	.569	1.241
.080	11.070	4.034	18.170	1.044	.606	1.259
.090	11.640	4.356	18.868	1.066	.639	1.276
.100	12.191	4.675	19.535	1.086	.670	1.291
.150	14.762	6.262	22.563	1.169	.797	1.353
.200	17.187	7.895	25.312	1.235	.897	1.403
.250	19.583	9.628	27.948	1.292	.984	1.446
.300	22.017	11.501	30.561	1.343	1.061	1.485
.350	24.543	13.554	33.216	1.390	1.132	1.521
.400	27.206	15.831	35.968	1.435	1.200	1.556
.450	30.058	18.385	38.873	1.478	1.264	1.590
.500	33.157	21.284	41.996	1.521	1.328	1.623
.550	36.575	24.612	45.421	1.563	1.391	1.657
.600	40.409	28.482	49.264	1.606	1.455	1.693
.650	44.794	33.047	53.702	1.651	1.519	1.730
.700	49.932	38.508	59.030	1.698	1.586	1.771
.750	56.140	45.138	65.783	1.749	1.655	1.818
.800	63.965	53.280	75.037	1.806	1.727	1.875
.850	74.473	63.426	89.160	1.872	1.802	1.950
.900	90.180	76.755	113.975	1.955	1.885	2.057
.910	94.446	80.077	121.387	1.975	1.904	2.084
.920	99.309	83.748	130.144	1.997	1.923	2.114
.930	104.947	87.871	140.676	2.021	1.944	2.148
.940	111.622	92.602	153.638	2.048	1.967	2.186
.950	119.755	98.184	170.104	2.078	1.992	2.231
.960	130.070	105.029	191.978	2.114	2.021	2.283
.970	143.977	113.930	223.100	2.158	2.057	2.348
.980	164.793	126.705	272.924	2.217	2.103	2.436
.990	203.877	149.389	376.044	2.309	2.174	2.575

a. Logarithm base = 10.

Berdasarkan tabel diatas terlihat nilai ED-50 terletak pada dosis 33,157 µl/kg.



Gambar 2 Grafik prosentase efek dan log dosis

Berdasarkan grafik diatas didapatkan persamaan probit yaitu:

$$y = 0,4784x - 0,0865$$

$$R^2 = 0,915$$

Keterangan:

y = % efek ; prosentase penghambatan pertumbuhan parasit pada hari ke-4

x = log dosis

R = kekuatan sifat hubungan antara x dan y, hubungan dosis dengan prosentase penghambatan parasit memiliki hubungan yang sangat kuat.

Berdasarkan grafik diatas, dapat diketahui prosentase efek dari masing- masing dosis adalah kelompok perlakuan 1 sebesar 0,701 %, kelompok perlakuan 2 sebesar 0,921%, dan kelompok perlakuan 3 sebesar 0,989%.

PEMBAHASAN

Berdasar penghitungan parasit binatang coba, dilakukan analisis probit untuk menghitung ED-50 dari tiap mencit berdasarkan prosentase penghambatan pertumbuhan parasit pada hari ke-4. Nilai ED-50 terletak pada dosis 33,157 µl/kg. Hal ini sesuai dengan hipotesis yang menyebutkan bahwa minyak *Nigella sativa* dapat menurunkan parasitemia mencit *Balb-c* yang diinfeksi *Plasmodium berghei*.

Hal ini membuktikan bahwa komponen aktif dalam minyak *Nigella sativa* mampu menurunkan parasitemia. Minyak yang berasal dari biji *Nigella sativa* mengandung berbagai kelas alkaloid yang dapat memblok

sintesis protein *Plasmodium falciparum*.⁸ Biji *Nigella sativa* juga mengandung phenolic, molekul ini dikenal memiliki *diverse physiological properties*, diantaranya telah terbukti sebagai anti karsinogenik, antiinflammasi, dan antiparasit.⁹ Biji *Nigella sativa* telah terbukti memiliki efek imunomodulator potensial antara lain kandungan herbal melanin yang terdapat pada *Nigella sativa* dapat merangsang peningkatan TNF-alpha, IL-6, dan produksi VEGF oleh sel monosit, sehingga mempengaruhi pada hubungan inter host-parasit.⁶ Selain itu, minyak dari *Nigella sativa* memiliki efek antioksidan, komponen tersebut menimbulkan suatu mekanisme yang dapat mempengaruhi terjadinya aktivitas antimalaria. Komponen biji *Nigella sativa* dapat menghambat produksi Nitrit Oksid (NO) pada makrofag.¹⁰ NO berperan dalam mekanisme membunuh parasit intraselluler potensial pada makrofag dan makrofag berperan dalam respon imunitas seluler. Proses penghambatan ini akan menyediakan suatu lingkungan yang mendukung untuk terjadinya multiplikasi parasit intraselluler. Walaupun terjadi penghambatan satu mekanisme membunuh parasit tetapi dapat menyebabkan peningkatan regulasi suatu mekanisme sekunder, dimana parasit tidak dapat berlindung. Penghambatan produksi NO menyebabkan peningkatan degradasi triptofan melalui induksi deoksigenasi indolamine pada makrofag peritoneal manusia.¹¹ Kemudian parasit kekurangan asam amino esensial sehingga menyebabkan terjadinya kematian. Aktivitas antimalaria minyak biji *Nigella sativa* yang diteliti pada penelitian ini dapat merupakan hasil dari satu atau kombinasi dari beberapa mekanisme

tersebut. Akan tetapi komponen aktif yang bertanggungjawab pada mekanisme antimalaria belum sepenuhnya diidentifikasi, sehingga membutuhkan penelitian lebih lanjut.

SIMPULAN

Penelitian ini sesuai dengan hipotesis bahwa pemberian minyak *Nigella sativa* dapat menurunkan parasitemia mencit *Balb-c* yang diinfeksi *Plasmodium berghei*. Berdasarkan hasil analisis probit, maka didapatkan nilai ED-50 terletak pada dosis 33,157 μ l/kg.

SARAN

Penelitian lebih lanjut diperlukan untuk mengetahui komponen aktif atau bahan aktif yang terkandung dalam biji *Nigella sativa* yang berperan pada mekanisme antimalaria, uji toksisitas *Nigella sativa* untuk mengetahui apakah terdapat efek toksik jaringan yang bisa terjadi pada organ hepar dan ginjal. Penelitian dikembangkan dengan menggunakan *Nigella sativa* dengan variasi dosis lebih kecil dan variasi lebih banyak.

DAFTAR PUSTAKA

1. Sugiyanto. Pengalaman Program Pemberantasan Malaria di Propinsi Kalimantan Timur. Dalam Simposium Kontrol Malaria di Indonesia Pusat Penyakit Tropis Universitas Airlangga; 2004 November 29-30. Indonesia. Surabaya: Media Pustaka; 2005.

2. Gunawan S. Epidemiologi Malaria, Dalam: Harijanto PN. Malaria Epidemiologi, Patogenesis, Manifestasi Klinis & Penanganan. Jakarta: EGC; 2003.
3. Redaksi Trubus. Trio Herbal, My Healthy Life. Jakarta: Trubus Swadaya; 2010.
4. El-Obeid A, Al- Harbi S, Al-Jomah N and Hassib A. Herbal melanin modulates tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha), interleukin 6 (IL-6) and vascular endothelial growth factor (VEGF) production. J Of Phytother and Phytopharm. May 2006; 13 (5); 324-33.
5. Redaksi Trubus. Trio Herbal, My Healthy Life. Jakarta: Trubus Swadaya; 2010.
6. El-Hadi MA, Bakri YMN, Yousif GM, Hassan SK. Antiplasmodial activity of some medicinal plants used in sudanese folk-medicine. Environ Health Insight [internet]. 2010 [cited 2010 Nov 29]; 4: 1-6. Available from: PubMed.
7. Abdullellah HAA, Abidin BAHZ. In Vivo Anti-malarial Tests of Nigella sativa (Black Seed) Different Extracts. American Journal of Pharmacology and Toxicology 2 (2): 46-50; 2007.
8. Morikawa T, Xum F, Ninomiya K, Matsuda H, Yoshikawa M. Nigellamines A3, A4, A5 and C, new dolabellane-type diterpene alkaloids, with lipid metabolism-promoting activities from the Egyptian medicinal food black cumin. Chem. Pharm. Bull. (Tokyo), 52: 494– 497; 2004
9. Nergiz, C. and S. Otles, 1993. Chemical composition of Nigella sativa L. seeds. Food Chem., 48: 259-261.
10. Mahmood, M.S., A.H. Gilani, A. Khwaja, A. Rashid and M K. Ashfaq, 2003. The in vitro effect of aqueous extract of Nigella sativa seeds on nitric oxide production. Phytother Res., 17: 921– 924.
11. Daubener, W., 1999. Interleukin-1 inhibit gamma interferon-induced bacteriostasis in human uroepithelial cells. Infection and Immunity, 67: 5615-5620.