

RESPON *TUMOUR NECROSIS FACTOR* ALFA (TNF- α) DALAM DARAH DAN LIMPA MENCIT YANG DIVAKSINASI DENGAN *P.berghei* RADIASI

Darlina, Tur R., dan Teja K.

Pusat Teknologi Keselamatan dan Metrologi Radiasi, BATAN

Email: mdarlina@batan.go.id

ABSTRAK

RESPON *TUMOUR NECROSIS FACTOR* ALFA (TNF- α) DALAM DARAH DAN LIMPA MENCIT YANG DIVAKSINASI DENGAN *P.berghei* RADIASI. Tumor nekrosis factor adalah suatu glikoprotein yang berasal dari sel limfosit T helper yang berperan penting pada respon tubuh melawan infeksi malaria. Tetapi TNF- α berperan ganda yaitu pada kadar yang tepat akan memberikan perlindungan dan penyembuhan, sedang pada kadar berlebihan yang mungkin merupakan tanggapan terhadap hiperparasitemia. Dengan demikian dilakukan penelitian untuk mengetahui ekspresi TNF alfa yang disekresi sel limfosit darah maupun limpa pada mencit yang diinfeksi dengan 1×10^7 *P.berghei* infeksius maupun dilemahkan dengan radiasi. Kadar tumor dalam serum dan medium biakan sel limpa dimonitor pada hari ke-2, 7, 14 paska infeksi. Pengamatan pertumbuhan parasit dilakukan setiap dua hari sekali selama 60 hari. Penentuan kadar TNF alfa dilakukan dengan menggunakan metode ELISA. Hasil penelitian menunjukkan parasitemia mencit yang diinfeksi dengan parasit yang diradiasi 175 Gy memiliki periode prepaten 16 hari lebih lama dari kontrol (parasit yang tidak diradiasi) dengan parasitemia rendah. Kadar TNF alfa dalam limpa mencit vaksinasi lebih tinggi dari mencit kontrol. Kadar TNF alfa dalam darah mencit vaksinasi lebih rendah dari mencit kontrol. Disimpulkan bahwa sekresi TNF alfa oleh limfosit darah lebih disebabkan faktor patogenik dari parasit sedangkan sekresi TNF alfa dalam limpa disebabkan respon imun terhadap parasit

Kata kunci: Limfosit, Limpa, mencit, vaksinasi, *P.berghei*, tumor necrosis factor alfa

ABSTRACT

RESPONSE OF *TUMOUR NECROSIS FACTOR* ALPHA (TNF) IN BLOOD AND SPLEEN MICE THAT VACCINATED WITH *P.berghei* RADIATION. Tumor necrosis factor is a glycoprotein derived from helper T lymphocytes that play an important role in the body's response against malaria infection. However, TNF- α has double play that is on appropriate levels will provide protection and healing, while at excessive levels which may be a response to hiperparasitemia. Thus investigated the expression of TNF alpha secreted blood lymphocytes and spleen cells the mice that's infected with 1×10^7 *P.berghei* infectious or inactivated by radiation. Levels of TNF alpha serum and spleen cell culture medium was monitored on days 2, 7, 14 post-infection. Monitoring of parasite growth every two days for 60 days. Determination of TNF alpha levels were measure using ELISA. The results showed parasitaemia mice infected with 175 Gy irradiated parasites have prepaten period of 16 days longer than the control (non-irradiated parasites) with low parasitaemia. TNF alpha concentration that secreted spleen cells of mice vaccinated higher than control mice. Concentration of TNF alpha that secreted blood lymphocyte of mice vaccinated lower than control mice. It was concluded that the secretion of TNF alpha by blood lymphocytes caused more pathogenic factors of the parasite, while the secretion of TNF alpha in spleen due to an immune response against the parasite.

Key words : Lymphocytes, spleen, mice, vaccination, *P.berghei*, tumor necrosis factor alfa

PENDAHULUAN

Penyakit malaria disebabkan oleh protozoa genus *Plasmodium*, yang ditularkan oleh nyamuk *Anopheles* betina, dan sudah dikenal sejak 3000 tahun yang lalu. Ada 4 jenis *Plasmodium* yang menyebabkan penyakit malaria pada manusia yaitu *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malariae*, dan *Plasmodium ovale*. Diantaranya *Plasmodium falciparum* (*P.falciparum*) adalah yang terpenting karena penyebarannya luas,

angka kesakitan tinggi serta bersifat ganas, hingga sering menyebabkan malaria berat dan menimbulkan lebih dari 2 juta kematian tiap tahun di seluruh dunia [1]. *Plasmodium berghei* merupakan parasit rodensia yang hampir sama dalam siklus hidup maupun morfologinya, genetik dan pengaturan genomnya, fungsi dan struktur pada kandidat vaksin antigen target dengan parasit menyerang manusia. Sehingga penelitian berbagai aspek imunitas pada pengembangan vaksin malaria banyak menggunakan model *P.berghei* dan mencit sebagai hospesnya [2].

Pemanfaatan radiasi gamma untuk menghasilkan suatu imunogen yang potensial sudah banyak diteliti [3]. Pemberian imunogen yang diiradiasi sinar gamma ternyata dapat menghasilkan antibodi yang dapat menahan serangan infeksi parasit [3]. Dalam penelitian malaria sebelumnya telah dilakukan optimasi dosis 150 dan 175 Gy dengan menggunakan dua kali imunisasi dan diketahui bahwa dosis 175 Gy merupakan dosis optimum dalam melemahkan parasit dibuktikan dengan mencit yang diimunisasi dengan *P.berghei* yang diiradiasi 175 Gy mempunyai periode prepaten yang paling lama, puncak parasitemia yang rendah. Imunisasi ulang (*booster*) *P.berghei* yang diiradiasi dengan dosis 175 Gy dapat memacu respon imun yang dibuktikan semua mencit masih hidup 2 minggu pasca ujiantang [4].

Secara umum dikatakan imunitas terhadap malaria sangat kompleks karena melibatkan hampir seluruh komponen sistem imun baik imunitas spesifik maupun non spesifik, imunitas humoral maupun seluler yang timbul secara alami maupun didapat sebagai akibat infeksi. Sejak permulaan invasi stadium sporozoit yang diikuti stadium selanjutnya menimbulkan reaksi sitokin yang demikian kompleks terhadap parasit malaria sebagai akibat terpaparnya berbagai jenis sel sistem imun terhadap berbagai macam antigen plasmodium [5].

Sitokin adalah suatu glikoprotein yang berasal dari sel T helper, sel natural killer (NK) dan makrofag, yang berperan penting pada respon tubuh melawan infeksi malaria. Sel T helper terdiri dari dua subset, masing-masing menghasilkan sitokin yang mengatur perbedaan fungsi imun efektor dan bereaksi satu sama lain. Sel T helper tipe 1 (Th-1). TNF- α merupakan salah satu sitokin yang dihasilkan sel Th-1 yang menghambat pertumbuhan stadium darah parasit dengan mengaktifkan sistem imun seluler dan makrofag, juga dapat membunuh parasit secara langsung namun aktifitasnya hanya lemah [6]. TNF- α akan menyebabkan demam, depresi eritropoiesis dan meningkatnya eritrofagositosis yang akan berkontribusi terjadinya anemia dan secara langsung menyebabkan gejala non spesifik dari malaria [7]. Adanya peran ganda dari sitokin terutama TNF- α yaitu pada kadar yang tepat akan memberikan perlindungan dan penyembuhan, sedang pada kadar berlebihan yang mungkin merupakan tanggapan terhadap hiperparasitemia dan pertumbuhan parasit yang berlebihan akan menyebabkan kerusakan jaringan yang sangat berat dan fatal [8].

Penelitian berbagai aspek parasitologi, imunologi, dan pengembangan vaksin malaria banyak menggunakan parasit rodensia dan mencit sebagai hospesnya, terutama *Plasmodium berghei*. *Plasmodium berghei* banyak digunakan dalam penelitian dan pengembangan biologi pada parasit

malaria pada manusia karena sudah tersedianya teknologi pembiakan secara *in vitro* dan pemurnian pada tahapan siklus hidup, pengetahuan pada susunan genom dan pengaturannya [2]. Bahkan hasil analisis molekuler menyampaikan bahwa *Plasmodium berghei* sama seperti plasmodium yang menginfeksi manusia. Dengan model ini kemungkinan dapat dilakukan manipulasi pada hospes sehingga dapat dipelajari perubahan imunologis yang terjadi selama infeksi malaria. Tujuan penelitian ini untuk mengetahui ekspresi TNF- α , parasitemia pada infeksi malaria *P.berghei* stadium eritrositik radiasi.

METODE PENELITIAN

Etik Penelitian

Protokol penelitian yang dilakukan telah disetujui oleh Komisi Etik Penggunaan dan Pemeliharaan Hewan Percobaan di Badan Tenaga Nuklir Nasional (BATAN) Surat No. 003/KEPPHP-BATAN/X/2012 2012.

Hewan Coba

Mencit strain *Swiss Webster* jantan, berumur 8-10 minggu, berat sekitar 25-30 gram diperoleh dari kementerian kesehatan Jakarta dan dikarantina terlebih dahulu sekitar 7 hari sebelum digunakan. Mencit dipelihara dalam kandang *fiber glass* dengan tutup *stainless steel* serta diberi makanan pelet dan minuman secara *ad libitum* (secukupnya) [8]. Mencit dibagi menjadi 2 kelompok perlakuan (Kontrol; mencit yang diinfeksi dengan parasit yang tidak diiradiasi, vaksin; mencit yang divaksinasi dengan parasit yang diiradiasi 175 Gy). Setiap kelompok perlakuan digunakan 12 ekor mencit.

Pembuatan Bahan Vaksin

Bahan vaksin merupakan stok beku *Plasmodium berghei* strain Antwerpen-Kasapa (ANKA) dibiakkan secara *in vivo* dalam tubuh mencit Swiss di Laboratorium Hewan Bidang Biomedika PTKMR. Kepadatan parasit (parasitemia) dalam darah diperiksa setiap hari dengan memotong ujung ekor mencit. Bila tingkat parasitemia mencit telah mencapai di atas 20% maka dilakukan pengambilan darah dari jantung. Pengambilan darah dari jantung dilakukan setelah mencit dianestesi dengan eter. Darah ditampung dalam tabung mikrosentrifuse kemudian dilakukan radiasi pada dosis 175 Gy dengan laju dosis 380,5 Gy/jam dengan menggunakan sumber Cobalt-60 pada fasilitas "Irradiator IRPASENA", Pusat Aplikasi Teknologi Isotop dan Radiasi-BATAN. Mencit kontrol dan 175 Gy diinfeksi dengan menyuntikkan secara intraperitoneal 0,3 ml yang

mengandung $\pm 1 \times 10^7$ parasit, dan NaCl 0,85% untuk kelompok mencit kontrol. Setiap 2 hari sekali pasca infeksi dilakukan pengamatan parasitemia hingga hari ke-60.

Penghitungan Parasitemia

Penghitungan parasitemia dilakukan dengan membuat apusan darah tipis. Sebanyak 5 μ L darah dibuat apusan tipis difiksasi dengan metanol dan diwarnai dengan larutan Giemsa 10% selama 30 menit setelah itu dicuci pada air mengalir. Pemeriksaan dan penghitungan sel dilakukan di bawah mikroskop pembesaran 100 \times .

Parasitemia dihitung menggunakan persamaan 1 menunjukkan kepadatan sel darah terinfeksi parasit dalam ± 5000 sel darah merah atau 10 lapang pandang dengan rumus [9] :

$$\frac{\sum \text{sel darah merah yang terinfeksi parasit}}{\sum \text{total sel darah merah}} \times 100 \%$$

Koleksi Serum

Pada hari ke-2, 7, 14 dilakukan koleksi serum dari setiap kelompok mencit dengan mengambil darah dari fungsi jantung. Darah disentrifugasi 1500 rpm selama 10 menit untuk memisahkan serum dari sel darah. Serum kemudian disimpan pada -20 $^{\circ}$ C sampai saat pengukuran.

Isolasi dan Kultur Sel Limfosit Limfa

Pada hari ke-2, 7, 14 dilakukan isolasi dan kultur limfosit limpa mencit Swiss. Dari 3 kelompok mencit masing-masing kelompok dibunuh 3 ekor mencit dengan narkose menggunakan kloroform. Mencit diletakkan dengan posisi telentang, kulit dibersihkan dengan alkohol 70%. Kulit bagian perut dan selubung peritoneal dibuka, limpa diangkat dan diletakkan dalam cawan petri diameter 50 mm yang berisi 5 ml RPMI 1640. Limpa dicabik-cabik untuk mendapatkan suspensi sel tunggal yang kemudian ditampung dalam tabung sentrifus untuk dilakukan sentrifugasi pada 1.200 rpm, 4 $^{\circ}$ C selama 10 menit. Pellet yang didapat diresuspensikan dalam 2 ml Tris buffered ammonium chlorida untuk melisiskan eritrosit dengan cara mencampurnya dan didiamkan pada suhu ruangan selama 2 menit. Kemudian ditambah 1 ml *Foetal Bovine Serum* (FBS) pada dasar tabung dan disentrifus lagi selama 5 menit. Supernatan yang terbentuk dibuang dan pelletnya dicuci 2x dengan medium RPMI. Sel-sel limpa yang didapat diresuspensikan dalam medium tumbuh di dalam cawan petri dan diinkubasikan pada 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ selama 2 jam. Sel-sel yang tidak melekat adalah limfosit, diambil dan diresuspensikan lagi dalam medium tumbuh [10].

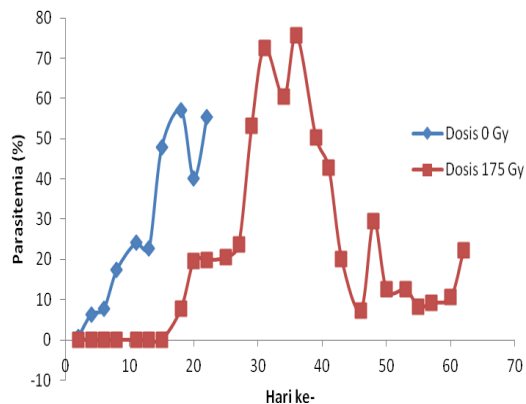
Sekresi TNF alfa oleh limfosit T limpa dapat diukur dengan menginkubasikan limfosit dengan konsentrasi 1×10^6 /ml dan diinkubasi dalam medium tumbuh yang mengandung PHA 5 mg/ml dalam mikrokultur 24 sumuran selama 72 jam di dalam inkubator 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂. Supernatan kultur dikoleksi untuk Uji TNF alfa dan sebelum dilakukan uji dapat disimpan pada -20 $^{\circ}$ C.

Pengukuran kadar TNF Alfa

Kadar TNF alfa dalam serum dan limfa diukur secara ELISA dengan menggunakan *mouse TNF alfa test kit* dari DRG dan dibaca dengan alat ELISA reader pada panjang gelombang 450 nm [11].

HASIL DAN PEMBAHASAN

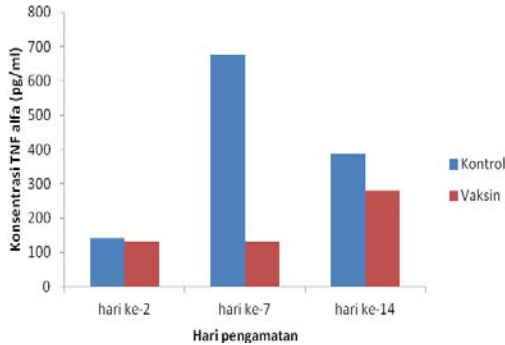
Dalam keadaan normal *P berghei* menyebabkan infeksi yang akut dan berat. Pada kelompok mencit Swiss yang tidak diimunisasi dan diinfeksi dengan 1×10^7 parasit stadium eritrositik, parasitemia sudah dapat terdeteksi pada pemeriksaan apus darah tepi pada hari ke-2 pasca infeksi. Parasitemia meningkat dengan cepat hingga mencapai puncak pada hari ke-18 pasca infeksi dengan parasitemia 57%, kematian pada kelompok ini terjadi sekitar hari ke-22 pasca infeksi. Pada kelompok mencit yang diimunisasi, periode prepaten memanjang menjadi 16 hari. Parasitemia meningkat hingga mencapai 60 % pada hari ke-34 pasca infeksi, kemudian menurun dan 75% mencit hidup hingga hari ke-60.



Gambar 1. Perubahan parasitemia mencit kontrol dan mencit vaksinasi.

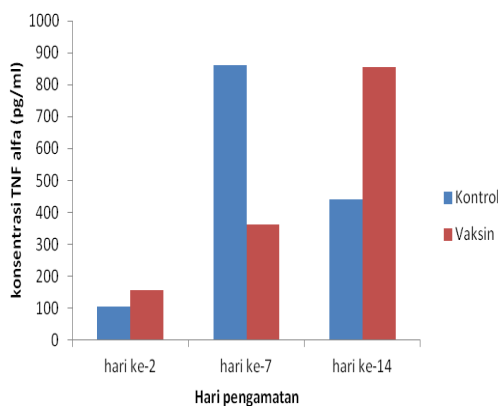
Tingkat konsentrasi TNF alfa yang disekresi sel limfosit T darah ke dalam serum diamati pada hari ke-2, 7, dan 14 pasca infeksi. Konsentrasi TNF alfa diukur dengan menggunakan metode ELISA. Konsentrasi TNF alfa serum antara kelompok mencit kontrol dan mencit yang divaksin di hari ke-2 pasca

infeksi terlihat tidak terjadi perbedaan. Pada hari ke-7, konsentrasi TNF alfa serum mencit kontrol meningkat hingga 4 kali kemudian menurun pada hari ke-14. Sedangkan TNF alfa pada serum mencit vaksinasi hampir tidak terjadi peningkatan pada hari ke-7 kemudian meningkat dua kali di hari ke-14.



Gambar 2. Kadar TNF alfa dalam serum mencit kontrol dan mencit vaksinasi.

Sekresi TNF alfa oleh limfosit T limpa mencit pada hari ke-2, 7 dan 14 dapat diukur dengan menginkubasikan sel limfosit dalam medium tumbuh yang mengandung PHA selama 72 jam, kemudian supernatan dipisahkan dari sel dengan sentrifus. TNF alfa yang disekresi sel dalam supernatan akan diukur dengan metode ELISA. Konsentrasi TNF alfa yang disekresi sel limfosit limpa dihari ke-2 pada mencit divaksinasi lebih tinggi dibandingkan mencit kontrol, kemudian meningkat terus sampai hari ke-14. Konsentrasi TNF alfa pada mencit kontrol meningkat tajam di hari ke-7 kemudian menurun di hari ke-14.



Gambar 3. Kadar TNF alfa dalam limpa mencit kontrol dan mencit vaksinasi.

Dari hasil penelitian di atas terlihat adanya korelasi antara konsentrasi TNF alfa dalam serum dengan kepadatan parasit dalam darah pada mencit kontrol. Pada hari ke-2, parasit mulai terdeteksi dalam darah mencit kontrol, kepadatan parasit terus meningkat hingga hari ke-7, demikian juga konsentrasi TNF alfa pada serum mencit kontrol lebih tinggi meningkat pada hari ke-7. Sedangkan mencit divaksinasi hingga hari ke-7 belum terlihat adanya parasit di dalam darah, konsentrasi TNF alfa pada hari ke-2 lebih rendah dibandingkan mencit kontrol hingga pada hari ke-7 tidak terjadi kenaikan. Tetapi konsentrasi TNF alfa pada mencit kontrol menurun pada hari ke-14 walaupun terjadi peningkatan kepadatan parasit. Pada mencit yang divaksinasi konsentrasi TNF alfa meningkat di hari ke-14 parasit mulai terdeteksi pada apusan.

Dari beberapa penelitian dilaporkan kadar TNF alfa meningkat seiring dengan meningkatkan keberadaan parasit darah bentuk skizon yaitu bentuk parasit yang aktif membelah(10,12.). Gejala khas malaria terjadi pada saat skizon ruptur, toksin dari parasit menyebabkan sel hospes melepaskan sitokin, seperti TNF (12). Konsentrasi TNF alfa mencit kontrol pada hari ke-7 lebih tinggi dibandingkan hari ke-14 dimungkinkan bentuk skizon merupakan bentuk parasit yang dominan. Dari penelitian Angulo *et al.*, 2002 yang menggunakan antigen analog dari parasit *P. falciparum* manusia juga menginduksi sekresi TNF oleh monosit darah manusia dan kultur eritrosit *P. falciparum* menginduksi sekresi TNF oleh sel mononuklear manusia, dengan angka peningkatan yang paling tajam dari sekresi terjadi segera setelah skizon ruptur. Banyak bukti mengarah pada glycosylphosphatidylinositol dari *Plasmodium* sebagai faktor patogenik penting dalam kemampuannya menginduksi TNF- α dan IL-1 [12]

Pola kenaikan konsentrasi TNF alfa yang disekresi limfosit darah maupun yang di sekresi sel limfosit limpa pada mencit kontrol sama. Tetapi pada mencit vaksinasi terdapat perbedaan pola konsentrasi TNF, pada hari ke-7 konsentrasinya dilimpa meningkat sedangkan di serum tetap. Pada hari ke-14, TNF alfa yang disekresi sel Limfosit limpa lebih tinggi dibandingkan keberadaannya di serum, bahkan konsentrasi TNF alfa yang disekresi sel limfosit limpa mencit vaksinasi lebih tinggi dibandingkan kontrol. Hal ini membuktikan sel limfosit limpa mencit yang divaksinasi lebih teraktivasi mensekresi TNF alfa yang akan memproduksi makrofag yang akan memfagositosis parasit.

Limpa merupakan tempat mempertemukan antigen parasit dengan sistem imun dan diduga limpa adalah tempat utama pengaturan sistem imun untuk menentukan komponen imunitas yang akan diaktifkan [13]. Limpa merupakan salah satu organ

yang bertanggung jawab terhadap pemenuhan kebutuhan limfosit. Limfosit merupakan sel yang berperan dalam respon imun karena mempunyai kemampuan untuk mengenali antigen melalui reseptor permukaan khusus dan membelah diri menjadi sejumlah sel dengan spesifitas yang identik serta masa hidup yang panjang menjadikan sel yang ideal untuk respons adaptif [14].

TNF alfa merupakan sitokin atau mediator yang dihasilkan oleh sel limfosit dalam reaksi radang atau imunologik yang berfungsi sebagai isyarat antara sel-sel untuk membentuk jaringan komunikasi dalam respon imun. Sitokin tersebut mempengaruhi peradangan dan imunitas melalui pengaturan pertumbuhan, mobilitas dan diferensiasi lekosit dan sel-sel jenis lain. Aktivasi dari sel T, sel B, dan makrofag oleh TNF dapat meningkatkan sel T spesifik dan respon antibodi terhadap patogen dan mempercepat pelenyapan patogen yang dicerna oleh makrofag. Meskipun setiap sitokin ini dapat melindungi hospes yang terinfeksi, produksi yang berlebihan dapat meningkatkan patologi dan dapat menyebabkan kematian hospes. Ini terutama ditandai dengan produksi berlebih dari TNF seiring dengan hiperparasitemia. Sehingga respon TNF terhadap parasit mempunyai efek 'pedang bermata dua' dapat dilihat dari analisis respon imun terhadap patogen protozoa [14]. Tingginya konsentrasi TNF alfa dalam darah mencit kontrol disebabkan

KESIMPULAN

Dari hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa parasitemia, dan kadar TNF alfa dalam darah mencit yang diinfeksi dengan parasit radiasi 175 Gy lebih rendah dari mencit 0 Gy. Kadar TNF alfa dalam limpa mencit yang diinfeksi dengan parasit radiasi 175 Gy lebih tinggi dari mencit 0 Gy. Disimpulkan bahwa keberadaan TNF alfa dalam darah lebih disebabkan patogenesis dari parasit sedangkan keberadaan TNF alfa dalam limpa disebabkan respon imun terhadap parasit.

DAFTAR PUSTAKA

1. *Pedoman Penatalaksanaan Kasus Malaria Di Indonesia*, Direktorat Jenderal Pengendalian Penyakit dan Penyehatan Lingkungan Departemen Kesehatan RI, 2009.
2. Anna L.G., Emily K.F., *The Utility Plasmodium Berghei as A Rodent Model for Anti-Merozoite Malaria Vaccine Assesment*, Sciencetific Reports 3, article number 1706, 2045-2322, 2013.
3. Raz eyal, Joshua ferrer., *Using Gamma Radiation Preserves T-Cell Responses in Bacteria Vaccine*, Professor of Medicine at

University of California, San Diego (UCSD) School of Medicine, 2006.

4. Darlina dan Tur Rahardjo, *The Humoral Immunity Response in Mice Injected With Gamma Irradiated Plasmodium berghei*, Proceeding of International Conference on Biomedical Sciences (ICBS), Bandung 27 – 28 February, 2012.
5. Riley EM WS, Perkins DJ, Schofield L., *Regulating Immunity to Malaria*, Parasite, Immunology 28:35-49, 2006.
6. Abbas AK, Litchman AH, Pillai S. *Chapter 12. Cytokines, Chapter 13 Effector Mechanism of Cell-mediated Immunity, Chapter 14 Effector Mechanism of Humoral Immunity*, In:Celluler and Molecular Immunology. 21 ed. Philadelphia; 2007.
7. Wather M., Woodruff J., Edele F., Tongren J.E., Andrews L., *Innate Immune Responses to Human Malaria: Heterogenous Cytokine Responses to Blood Stage Plasmodium Falciparum Correlate With Parasitology and Clinical Outcomes*, J.Immunol., 177, 5736-5745, 2006.
8. Beeson J. G., Faith H.A.O., Christian R.E., *Recent Insight Humoral and Cellular Immune Response Against Malaria*, Trends in Parasitology, Vol.24 No.12, 578-584, 2008.
9. Ljungstrom I., H. Perlaman, M. Schilchtherle, A. Shere & M. Wahlgreen, *Methods In Malaria Research*, MR4/ATCC, Manassas Virginia, 2004.
10. Arinola O.G., Onubogu D.I., Salimou L.S., *Spleen Weight, Liver Weight, and Levels of Circulating Immune Complexes in Vitamin Deficient Mice Infected with P.berghei*, African Jounal of Clinainal and Experimental Microbiology, Vol.6 No.2, 95-99. Alves, H. J., Weidanz, W., and Weiss, L., 2005.
11. DRG, *Mouse TNF Alfa Kit Prosedure Manual*.
12. Angulo I, Fresno M., *Cytokines in the Pathogenesis and Protection against Malaria*, Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology Vol. 9; 6: 1145-1152, 2002.
13. Harijanto PN, Nugroho A, Gunawan CA, *Malaria: dari Molekuler ke Klinis. Edisi ke-2*, Jakarta: Penerbit Buku Kedokteran EGC, 2012.
14. Ishartadiati K, *Peranan TNF, IL-1, dan IL-6 Pada Respon Imun Terhadap Protozoa*, Surabaya, 2009.

TANYA JAWAB**Prayitno**

- Terangkan mekanisme penentuan kadar TNF alfa yang dilakukan.
- Bagaimana uji coba kalau itu dilakukan pada manusia.
- Bagaimana cara penyuntikan apabila dilakukan dengan divaksinasi dengan P berghei radiasi.

Darlina

- *Penentuan kadar TNF alfa baik yang di dalam darah mampu dalam suspense untuk sel limpa dilakukan dengan metode Elisa.*
- *Uji coba pada manusia dilakukan pengukuran konsentrasi TNF alfa yang didarah saja.*
- *Radiasi untuk melemahkan P.berghei sehingga jika disuntikan ke dalam tubuh tidak akan menimbulkan infeksi tetapi akan memicu respon imun sehingga simencit akan mempunyai kekebalan terhadap P.berghei infeksi.*