

Sekresi Tumor Necrosis Factor dan Reactive Oxygen Intermediates oleh makrofag peritoneum mencit yang distimulasi dengan antigen terlarut *Plasmodium falciparum*

Mahardika Agus Wijayanti*, Supargiyono*, Loeki Enggar Fitri**

* Bagian Parasitologi Fakultas Kedokteran UGM Yogyakarta,

** Bagian Parasitologi Fakultas Kedokteran UNIBRAW Malang

ABSTRACT

Mahardika Agus Wijayanti, Supargiyono, Loeki Enggar Fitri – *Secretion of tumor necrosis factor and reactive oxygen intermediates from soluble antigens of Plasmodium falciparum stimulated-peritoneal mouse macrophages*

Background: Malarial infection is still one of major health problems in the world. In Indonesia, malarial infection is especially caused by *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax*. Host immune responses to malarial infection are complex mechanisms, including the humoral immunity by antibody and cellular immunity by T cells and activated effector cells. Macrophages as an effector cells kill malarial parasite by oxidative and non-oxidative mechanism. Tumor necrosis factor (TNF) and reactive oxygen intermediates (ROI) are mediators produced by macrophages which represent as non-oxidative and oxidative killing respectively.

Objectives: Understanding the secretion ability of tumor necrosis factor and reactive oxygen intermediates from soluble antigens of *P. falciparum* stimulated-peritoneal mouse macrophages.

Method: In this study, soluble antigens of *P. falciparum* stimulated-peritoneal mouse macrophages were tested to produce TNF and ROI *in vitro*. Secretion of TNF was measured by MTT assay and ROI by NBT reduction assay. Swiss mice were divided into two groups of 15 mice each. One group was stimulated by soluble antigens as experimental group and the other as control group.

Result: Secretion of TNF and ROI by soluble antigens of *P. falciparum* stimulated-peritoneal mouse macrophages were significantly higher ($p < 0,01$) than control group.

Conclusion: Soluble antigens of *P. falciparum* could activate mouse peritoneal cells *in vivo*. Therefore, mouse macrophages provide a convenient system for investigating the human malarial soluble antigens.

Key words : Soluble antigens of *Plasmodium falciparum* – Cellular Immunity – Macrophages – Tumor Necrosis Factor – Reactive Oxygen Intermediates

ABSTRAK

Mahardika Agus Wijayanti, Supargiyono, Loeki Enggar Fitri – *Sekresi tumor necrosis factor dan reactive oxygen intermediates oleh makrofag peritoneum mencit yang distimulasi dengan antigen terlarut Plasmodium falciparum*

Latar belakang penelitian: Penyakit malaria sampai saat ini masih merupakan salah satu masalah utama kesehatan baik di dunia maupun di Indonesia. Untuk wilayah Indonesia, penyakit malaria terutama disebabkan oleh infeksi *Plasmodium falciparum* dan *Plasmodium vivax*. Respon imunitas hospes terhadap infeksi malaria merupakan mekanisme yang sangat kompleks yang ditandai dengan timbulnya respon imunitas humoral yaitu dengan timbulnya antibodi dan imunitas selular yang diperankan oleh sel T dan sel-sel efektor yang diaktivasi. Makrofag sebagai salah satu sel efektor mampu membunuh parasit malaria baik secara oksidatif maupun non-oksidatif. *Tumor necrosis factor* (TNF) sebagai salah satu sitokin yang dihasilkan oleh makrofag berperan dalam kematian parasit secara non-oksidatif sedangkan *reactive oxygen intermediates* berperan dalam kematian parasit secara oksidatif.

Tujuan penelitian: Mengetahui kemampuan makrofag peritoneum mencit Swiss dalam mensekresi TNF dan ROI *in vitro* setelah distimulasi dengan antigen terlarut *P. falciparum*.

*Mahardika Agus Wijayanti, *Supargiyono, **Loeki Enggar Fitri,
Department of Parasitology, Faculty of Medicine, Gadjah Mada
University, **Brawijaya University, Indonesia

Metodologi: Dalam penelitian ini mencit Swiss dibagi menjadi 2 kelompok masing-masing 15 ekor. Satu kelompok distimulasi dengan antigen terlarut *P. falciparum in vivo* sebagai kelompok percobaan sedangkan satu kelompok yang lain tanpa stimulasi (sebagai kelompok kontrol).

Hasil penelitian: Sekresi TNF dan ROI *in vitro* dari makrofag peritoneum mencit Swiss yang telah distimulasi dengan antigen terlarut *P. falciparum* lebih tinggi secara bermakna dibanding kelompok kontrol ($p < 0,01$).

Simpulan: Dengan demikian antigen terlarut *P. falciparum* dapat dikenali dan mengaktivasi sel makrofag mencit Swiss *in vivo*.

(B.I.Ked. Vol. 31, No. 1:23-28, Maret 1999)

PENGANTAR

Lebih dari 2000 juta penduduk atau 40% penduduk dunia tinggal di daerah endemis malaria. Setiap tahun 100 juta orang terserang penyakit malaria dan 1 juta di antaranya (sebagian besar adalah anak) dilaporkan meninggal. Malaria masih menjadi salah satu penyakit yang mempunyai dampak sosial ekonomi yang cukup serius¹. Di Indonesia sampai saat ini angka kesakitan penyakit malaria masih cukup tinggi, terutama di daerah luar Jawa dan Bali. Di daerah transmigrasi yaitu daerah dengan campuran penduduk yang berasal dari daerah endemis dan tidak endemis malaria, masih sering terjadi letusan atau wabah yang menimbulkan banyak kematian². Di Indonesia spesies yang banyak dijumpai adalah *Plasmodium falciparum* dan *Plasmodium vivax*. *Plasmodium malariae* banyak dijumpai di Indonesia bagian Timur sedangkan *Plasmodium ovale* pernah ditemukan di Irian Jaya dan Nusa Tenggara Timur.

Infeksi *P. falciparum* pada orang yang tidak imun dapat menyebabkan gejala klinis yang berat dan apabila tidak diobati dapat menyebabkan kematian³. Gejala klinis yang berat ini diduga berhubungan dengan respon imun penderita dan kadar *Tumor Necrosis Factor* (TNF)^{4,5}.

Respon hospes terhadap infeksi malaria ditandai dengan timbulnya respon imunitas humoral yang diperankan oleh antibodi dan imunitas selular yang diperankan oleh limfosit T serta sel-sel efektor yang diaktivasi^{6,7}. Makrofag sebagai salah satu sel efektor yang teraktivasi selama infeksi akan menghasilkan TNF sebagai respon terhadap stimuli antigen terlarut yang dilepaskan oleh parasit. *Tumor necrosis factor* ini ternyata dapat menghambat kelangsungan hidup parasit pada mencit yang diinfeksi dengan malaria⁸. Selain TNF, makrofag yang teraktivasi juga akan melepaskan mediator yang bersifat

toksik terhadap parasit malaria seperti misalnya *reactive oxygen intermediates* (ROI) yang dapat menyebabkan kematian parasit di dalam eritrosit⁶.

Mekanisme kematian parasit secara oksidatif adalah akibat pembentukan anion superoksida (O_2^-), hidrogen peroksida (H_2O_2), *hidroksil radikal* (OH) dan *singlet oksigen* (1O_2) oleh makrofag. Parasit malaria stadium eritrositik lebih suseptibel terhadap stres oksidan, karena *reactive oxygen intermediate* (ROI) derivat parasit yang terbentuk di dalam eritrosit dapat menyebabkan kerusakan akibat peroksidasi membran lipid. Parasit itu sendiri mempunyai mekanisme pertahanan terhadap stres oksidan dengan pembentukan glutathion peroksidase, superoksida dismutase, katalase dan hemoglobin. Parasit di dalam eritrosit yang terpapar stres oksidan dapat rusak akibat oksidasi glutathion dan peroksidasi lipid membran eritrosit⁹.

Mekanisme kematian parasit malaria stadium eritrositik secara non-oksidatif di antaranya diperankan oleh TNF yang ada dalam sirkulasi. *Tumor necrosis factor* terutama dihasilkan oleh makrofag yang teraktivasi oleh lipopolisakarida (LPS). Walaupun sel T yang terstimuli dengan antigen, sel NK dan sel mast yang teraktivasi juga mensekresi TNF. Interferon - yang diproduksi oleh sel T - akan memperbesar sintesis TNF oleh makrofag¹⁰.

Peran TNF pada infeksi malaria sangat besar. Clark et al.⁸, menyatakan bahwa efek samping yang terjadi pada penderita kanker yang diobati dengan infus rekombinan TNF sama dengan gejala klinis yang terjadi pada malaria yaitu panas, rigor, pusing, mialgia, mual, muntah dan trombositopenia. Bahkan kadar TNF dalam serum berhubungan dengan terjadinya malaria serebral¹¹. Namun, menurut Clark et al.⁸, TNF ternyata dapat menghambat kelangsungan hidup parasit pada mencit yang diinfeksi dengan mala-

ria. Aksi TNF sangat tergantung pada jumlah atau kadarnya. Pada konsentrasi yang rendah berperan sebagai regulator parakrin dan autokrin dari leukosit dan sel endotelial. Sebagian besar aksi biologis TNF diperbesar dengan adanya IFN-. Pada beberapa sel yang menjadi target dari efek TNF, IFN- akan menstimulasi peningkatan jumlah reseptor TNF. Namun demikian, pada banyak kasus, peningkatan aktivitas TNF oleh IFN- dapat terjadi tanpa melibatkan ikatan TNF pada reseptor. Hubungan antara keduanya ini belum begitu jelas tetapi sel T yang teraktivasi biasanya akan mensekresi TNF dan IFN- secara teratur dan terkoordinasi sehingga akan memberi suatu peningkatan aksi TNF tanpa memerlukan konsentrasi tertentu. Berdasarkan hal tersebut di atas maka permasalahan pada penelitian ini adalah: Apakah makrofag peritoneum mencit Swiss dapat diaktivasi dengan antigen terlarut *P. falciparum*.

Tujuan utama dari penelitian ini adalah untuk mengetahui kemampuan makrofag peritoneum mencit dalam mensekresi TNF dan ROI *in vitro* setelah distimulasi dengan antigen terlarut *P. falciparum*.

BAHAN DAN CARA

1. Kultur *P. falciparum in vitro* dan isolasi antigen terlarut.

P. falciparum yang telah dibiakkan di laboratorium ditumbuhkan dalam medium RPMI yang mengandung 10% serum manusia dan diinkubasikan dalam inkubator CO₂ 5% dengan suhu 37°C. Medium diganti setiap hari, parasitemia dimonitor dengan membuat sediaan apus darah tipis. Jika parasitemia telah mencapai 5% maka dari kultur tersebut dapat diisolasi antigen terlarut dengan cara seperti yang dilakukan di laboratorium Flow, Irvine, UK¹¹. Supernatan kultur dibuang, pellet dicuci dengan PBS 3x, kemudian diresuspensikan dalam PBS lagi sehingga didapat konsentrasi 5x10⁵ parasit/ml. Suspensi sel diinkubasikan dalam *shaker waterbath* 37°C selama 24 jam. Suspensi sel disentrifugasi dan dikoleksi supernatannya yang mengandung antigen terlarut. Supernatan dipanaskan dalam air mendidih selama 2 menit kemudian difilter dengan membran filter 0,22 m. Kadar antigen diukur de-

ngan spektrofotometer dan selanjutnya disimpan pada -20°C sampai akan digunakan.

2. Aktivasi makrofag peritoneum mencit dengan antigen terlarut *P. falciparum in vivo*.

Pada penelitian ini mencit dibagi menjadi 2 kelompok, masing-masing 15 ekor. Lima belas ekor mencit sebagai kelompok uji diaktivasi dengan 0,2 ml antigen dengan kadar 5g yang disuntikkan secara intraperitoneal sebanyak 3x dengan selang waktu 1 minggu.

3. Isolasi makrofag peritoneum mencit Swiss. Mencit Swiss dibunuh dengan narkose menggunakan kloroform, kulit abdomen dibuka sehingga tampak selubung peritoneumnya. Disuntikkan ± 8 ml medium RPMI-1640 dingin ke rongga peritoneum, ditunggu ± 3 menit sambil ditekan-tekan, kemudian medium diaspirasi lagi. Sel yang didapat disentrifugasi pada 1200 ppm, 4°C selama 10 menit. Supernatan dibuang, pelet diresuspensikan dalam medium komplit dan dihitung dengan hemositometer sehingga didapat sel dengan kepadatan 2,5 x 10⁶/ml. Untuk uji sekresi ROI dikultur 200 l suspensi sel ke dalam setiap sumuran dari mikrokultur 24 sumuran yang telah diberi *coverslips* bulat selama 30 menit, ditambahkan 1ml medium komplit, kultur dilanjutkan selama 2 jam dalam inkubator CO₂, 37°C. Sel dicuci dengan Medium RPMI 2x untuk menghilangkan sel-sel yang tidak melekat. Satu ml medium komplit ditambahkan pada setiap sumuran dan kultur dilanjutkan sampai 24 jam.

4. Koleksi supernatan kultur makrofag peritoneum.

Makrofag dengan kepadatan 2,5 x 10⁶/ml dikultur dalam mikrokultur 24 sumuran dan dibiarkan melekat selama 24 jam dalam inkubator 5% CO₂, 37°C. Sel dicuci dengan RPMI dan sel-sel yang tidak melekat dibuang, makrofag distimulasi dengan 10µl LPS 1mg/ml. Kultur dilanjutkan selama 24 jam kemudian supernatannya dikoleksi untuk uji sekresi TNF.

5. Uji sekresi ROI *in vitro*.

Kemampuan makrofag untuk mensekresi ROI diukur dengan cara *nitroblue tetrazolium* (NBT) *reduction assay*, yaitu dengan mengukur reduksi NBT yang memerlukan anion superoksida (O₂-) menjadi presipitat formazan yang tidak terlarut. *Nitro blue tetrazolium* dilarutkan dalam PBS dengan konsentrasi 1mg/ml. Untuk menginduksi sekresi anion superoksida dari sel perlu ditam-

bahkan *phorbol miristate acetat* (PMA) pada larutan NBT sehingga didapat konsentrasi akhir 125 ng/ml. Makrofag yang telah dikultur 24 jam dicuci 2x dengan RPMI, kemudian diinkubasikan dalam 0,5 ml larutan NBT pada suhu 37°C, 5% CO₂ selama 60 menit. Sel kemudian dicuci dengan PBS 3x dan dipulas dengan *neutral red solution* 2%. Persentase sel yang menunjukkan reduksi NBT dihitung dari 100 sel yang diperiksa dengan mikroskop cahaya perbesaran 40x. Pemeriksaan diulang sebanyak 3x.

6. Uji sekresi TNF in vitro.

Kadar TNF dalam supernatan kultur makrofag ditentukan dengan mengukur aktivitas sitotoksiknya terhadap sel target L-929¹². Dalam setiap sumuran dari mikrokultur 96 sumuran diisi dengan 100 µl medium tumbuh yang mengandung 2x10⁵ sel L-929/ml dan dibiarkan selama 4 jam agar sel melekat satu lapis. Ditambahkan 100 µl supernatan kultur makrofag yang telah diencerkan pada tiap sumuran secara duplikat sehingga konsentrasinya menjadi 1/2, 1/4, 1/8, dan 1/16. Kultur diinkubasi selama 3 hari, kemudian diberi 10 µl 2,4mM larutan 3 (4,5-dimethyl-thiazol-2yl)-2,5 diphenyltetrazolium bromide (MTT) dengan konsentrasi 5 mg/ml PBS dan diinkubasi dalam inkubator CO₂ selama 4 jam. Setelah itu formazan yang terbentuk dilarutkan dengan 100 µl 0,04N HCL-Isopropanol dan absorbannya dibaca dengan ELISA reader pada panjang gelombang 550 nm. Sel yang diinkubasi dengan medium saja digunakan sebagai kontrol negatif atau standar 0%. Kontrol positif adalah sumuran yang mengandung medium tumbuh, sel target dan rekombinan TNF (Genzym). Persentase sitotoksik dapat dihitung menggunakan rumus 1 Unit TNF didefinisikan sebagai 50% kematian sel.

ANALISIS DATA

Analisis kadar TNF pada supernatan kultur makrofag dibandingkan antara kelompok uji dengan kelompok kontrol dengan uji-t. Perbedaan dianggap bermakna jika $p < 0,05$. Perbedaan sekresi ROI dari makrofag diukur dengan cara membandingkan persentase sel-sel yang menunjukkan reduksi NBT antara kelompok uji dan kelompok kontrol dengan uji-t. Antara kelompok uji dan kelompok kontrol dianggap berbeda bermakna jika $p < 0,05$.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Konsep yang menyatakan bahwa makrofag dan produk yang dihasilkannya memegang peranan penting dalam imunitas selular selama infeksi malaria didasarkan atas penelitian-penelitian terdahulu. Produk makrofag yang teraktivasi di antaranya adalah TNF dan ROI yang sampai saat ini tampaknya masih mempunyai peran proteksi dengan menghambat perkembangan parasit *in vivo*⁸.

Penelitian ini mengukur kemampuan makrofag peritoneum mencit Swiss untuk mensekresi TNF *in vitro* setelah diaktivasi dengan antigen terlarut *P. falciparum in vivo*. Hasil penelitian menunjukkan bahwa sekresi TNF lebih tinggi pada kelompok mencit yang diaktivasi dengan antigen terlarut daripada kelompok kontrol. (TABEL 1). Jika kadar TNF ini dibandingkan dengan uji-t maka terdapat perbedaan yang sangat bermakna ($t = 56,61; p < 0,01$).

TABEL 1. - Kadar TNF supernatan kultur makrofag mencit Swiss yang diaktivasi dengan antigen terlarut *P. falciparum* berdasarkan dilusi supernatan yang memberikan efek sitotoksik sebesar 50% terhadap sel target L-929

Mencit ke-	Kadar TNF (Unit/ml)	
	Kelompok Uji	Kelompok Kontrol
1	128,60	3,64
2	124,60	4,23
3	140,20	3,85
4	136,40	4,02
5	129,40	4,31
6	144,20	3,71
7	117,80	3,96
8	119,60	4,23
9	120,20	3,65
10	140,20	3,87
11	124,60	4,20
12	126,20	4,12
13	122,40	3,76
14	119,60	3,56
15	124,60	3,81
Rerata	127,91	3,93
SD	8,48	0,25

Kemampuan makrofag peritoneum mencit Swiss untuk mensekresi ROI diukur dengan NBT *reduction assay*. Reduksi NBT menunjukkan adanya lonjakan respirasi diikuti dengan pembentukan superoksida (O₂-) yang akan mereduksi NBT menjadi produk reaksi formazan yang tidak terlarut. Makrofag peritoneum mencit pada kelompok yang diaktivasi dengan antigen terlarut *P.*

falciparum maupun kelompok kontrol mampu mensekresi ROI. Persentase makrofag yang mensekresi ROI ini lebih tinggi pada kelompok yang diaktivasi dengan antigen terlarut (TABEL 2). Hasil analisis statistik dengan uji-t antara kedua kelompok ini menunjukkan perbedaan yang sangat bermakna ($t = 27,44; p < 0,01$).

TABEL 2. - Persentase sekresi *reactive oxygen intermediates* oleh makrofag peritoneum mencit Swiss yang distimulasi dengan antigen terlarut *P. falciparum*

Mencit ke-	Persentase sekresi ROI	
	Kelompok uji	Kelompok kontrol
1	36,27	13,46
2	35,00	14,02
3	46,23	19,30
4	36,28	16,36
5	39,05	18,52
6	40,51	18,24
7	37,95	17,20
8	41,05	15,09
9	37,89	14,20
10	38,45	12,95
11	39,04	12,45
12	41,87	13,67
13	39,65	16,40
14	40,12	15,90
15	38,30	14,25
Rerata	39,18	15,47
SD	2,70	2,15

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa aktivasi antigen terlarut *P. falciparum* pada mencit Swiss *in vivo* berpengaruh terhadap aktivitas fungsional makrofag untuk mensekresi TNF dan ROI. Keadaan tersebut dapat terjadi karena baik sel makrofag pada manusia maupun mencit keduanya mengekspresikan reseptor terhadap stimulasi antigen yang sama. Seperti diketahui bahwa sel makrofag pada manusia dan mencit keduanya akan mensekresi TNF jika distimulasi dengan LPS dan antigen terlarut *P. falciparum in vitro*¹³. Demikian pula halnya pada makrofag peritoneum mencit dapat mensekresikan TNF dan ROI setelah distimulasi dengan antigen terlarut *P. falciparum*. Bate et al.¹⁴ juga berhasil membuktikan bahwa eritrosit yang terinfeksi dengan *P. falciparum* akan menstimulasi secara langsung sekresi TNF dari makrofag mencit *in vitro*. Sekresi ini akan semakin meningkat jika yang digunakan adalah makrofag mencit yang telah diaktivasi dengan IFN- terlebih dahulu.

Plasmodium stadium eritrositik dapat menghasilkan berbagai macam antigen yang dapat diklasifikasikan menjadi 4 golongan yaitu antigen yang disekresikan, antigen permukaan merozoit, antigen *rhoptry* dan antigen permukaan eritrosit. Antigen yang disekresikan oleh plasmodium stadium eritrositik ini meliputi antigen terlarut (S-antigen), *glycophorin-binding protein* (GPB), dan *erythrocyte-binding antigens* (EBA). S-antigen adalah antigen terlarut yang bersifat stabil pada pemanasan dan dapat ditemukan pada serum penderita malaria. Sampai saat ini fungsi S-antigen masih belum diketahui dengan jelas meskipun antibodi monoklonal terhadap S-antigen *P. falciparum* dapat menghambat invasi merozoit pada eritrosit¹⁵. Antigen terlarut yang disekresikan oleh eritrosit terinfeksi *P. falciparum* dapat beraksi seperti LPS dan menstimulasi makrofag mencit untuk mensekresi TNF dan ROI *in vitro*. Antigen terlarut mengandung berbagai komponen yang bersifat antigenik seperti protein, karbohidrat, polisakarida dan fosfolipid. Kemampuan antigen terlarut dalam menstimulasi makrofag untuk mensekresi TNF tampaknya tidak tergantung pada kandungan protein ataupun karbohidrat, tetapi berhubungan dengan fosfolipid. Hal tersebut dibuktikan pada penelitian Bate dkk¹⁶ bahwa efek antigen terlarut dapat dihambat dengan penambahan fosfolipase C. Seperti halnya pada lipopolisakarida (LPS) komponen aktif dari antigen terlarut tergantung pada kandungan asam-asam lemaknya yang mungkin berupa O-acyl yang berikatan dengan gliserol karena efeknya dapat dipengaruhi dengan pemberian alkali dan lipase. Fosfolipid ini tampaknya bersifat imunogenik tinggi dan kandungan fosfolipid pada eritrosit yang terinfeksi *P. knowlesi* meningkat 6x. Sintesis fosfolipid terutama terjadi pada akhir siklus skizogoni.

Pada penelitian ini pemberian antigen terlarut dilakukan *in vivo* dengan harapan antigen terlarut *P. falciparum* dapat mengaktivasi makrofag baik secara langsung maupun tidak langsung. Makrofag berperan penting untuk mengeliminasi parasit intraeritrositik karena kemampuannya untuk membunuh parasit secara oksidatif maupun non-oksidatif yaitu di antaranya dengan mensekresi TNF dan ROI. Uji sekresi TNF dan ROI dilakukan *in vitro*, hal ini untuk menunjukkan bahwa tanpa pengaruh luar makrofag mencit yang

distimulasi dengan antigen terlarut lebih teraktivasi dibanding kelompok kontrol. Kandungan fosfolipid pada antigen terlarut yang tampaknya bersifat imunogenik tinggi ini dapat difikirkan untuk menjadi bahan dasar pembuatan *anti-disease vaccine*.

SIMPULAN

Sekresi *tumor necrosis factor* (TNF) dan *reactive oxygen intermediate* (ROI) pada kelompok mencit Swiss yang diaktivasi dengan antigen terlarut *P. falciparum* lebih tinggi secara bermakna dibanding kelompok kontrol. Antigen terlarut *P. falciparum* dapat dikenali dan mengaktivasi sel makrofag peritoneum mencit Swiss.

SARAN

Berdasarkan hasil penelitian di atas menunjukkan bahwa aktivasi *in vivo* dengan eksoantigen *P. falciparum* pada mencit Swiss dapat meningkatkan aktivitas fungsional makrofag peritoneum. Pada penelitian selanjutnya perlu diuji peran TNF dan ROI yang dihasilkan oleh makrofag tersebut dalam mengatasi infeksi *Plasmodium* pada mencit.

KEPUSTAKAAN

- Kondrachine AV. Global malaria control strategy an attainable goal. Abstract Vol.1. XIIth. International congress for tropical medicine and malaria. Thailand, 1992
- Direktur Jenderal P3M dan PLP. Malaria. Jakarta: Departemen Kesehatan RI, 1991
- Day KP. Naturally acquired immunity to *Plasmodium falciparum*. *Immunology today* 1991; 12:A68
- Grau GE, Taylor TE, Molyneux ME, Wirima JJ, Vassali P, Hommel M et al. Tumor Necrosis Factor and disease severity in children with *falciparum* malaria. *N Engl J Med* 1989; 320:1586-1590.
- Kwiatkowski D, Hill AVS, Sambow I, Twumasi P, Castracane J, Manoque K, et al. TNF concentration in fatal cerebral, nonfatal cerebral and uncomplicated *P. falciparum* malaria. *Lancet* 1990; 336:1201
- Melancon-Kaplan J, Weidanz WP. Role of cell-mediated immunity in resistance to malaria. In: Stevenson MM, editor. *Malaria: Host responses to infection* pp:37-64. Florida: CRC Press Inc, 1989
- Taylor DW. Humoral immune responses in mice and man to malarial parasites. In : Stevenson MM, editor. *Malaria: Host responses to infection*, pp:1-36. Florida: CRC Press Inc, 1989
- Clark IA, Hunt NH, Butkher GA, Cowden WB. Inhibition of murine malaria (*Plasmodium chabaudi*) *in vivo* by recombinant Interferon- or tumor necrosis factor and its enhancement by butylated hydroxamind. *J Immunol* 1997; 139: 3493-99.
- Playfair JHL, Jones KR, Taverne J. Cell-mediated immunity and its role in protection. In: Stevenson MM, editor. *Malaria : Host responses to infection*. Florida : CRC Press Inc, 1989, pp:65-86.
- Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. Cellular and molecular immunology. Philadelphia: WB Saunders Co, 1991.
- Grau GE, Piquet PF, Fontana A, Heremann H, Billion A, Vassalli. Tumor necrosis factor (Cachectin) as an essential mediator in murine cerebral malaria. *Science* 1987; 237 : 1210-1213
- Hudson L, Hay FC. Practical immunology, 3rd edition. London: Blackwell Scientific Publication, 1989 : 439-40.
- Taverne J, Bate CAW, Sarkar DA, Meager A, Rook GAW, Playfair JHL. Human and murine macrofages produce TNF in response to soluble antigens of *Plasmodium falciparum*. *Parasite Immunol* 1990; 12 : 33-43.
- Bate CAW, Taverne J and Playfair JHL. Malarial parasites induce TNF production by macrophages. *Immunology* 1989; 64 : 227-31.
- Melancon-Kaplan J, Burns Jr JM, Vaidya AB, Webster HK and Weidanz WP. Malaria. In : Warren KS. editor. *Immunology and Molecular Biology of Parasitic infections*, 3rd edition. pp:302-251. Boston: Blackwell Scientific Publication, 1993.
- Bate CAW, Taverne J, Roman E, Moreno C and Playfair JHL. Tumor necrosis factor induction by malaria exoantigens depen upon phospholipid. *Immunology* 1992; 75: 129-135