



UJI DAYA INFEKTIVITAS *Plasmodium berghei* IRADIASI PADA HATI, LIMPA MENCIT MENGGUNAKAN *NESTED-PCR*

Ngaliyatun¹✉, Tuti Widiarti¹, Mukh Syaifudin²

1 Jurusan Biologi, Fakultas MIPA, Universitas Negeri Semarang, Indonesia

2 Peneliti Biomedika PTKMR-BATAN

Info Artikel

Sejarah Artikel:

Diterima November 2013

Disetujui November 2013

Dipublikasikan

November 2013

Keywords:

Irradiation

Nested-Polymerase Chain Reaction

Plasmodium berghei

Abstrak

Plasmodium berghei adalah parasit jenis protozoa penyebab malaria pada rodensia yang ditularkan melalui gigitan nyamuk *Anopheles* betina. Iradiasi dapat menyebabkan perubahan struktur protein, degradasi protein maupun perubahan konformasi DNA. Dosis iradiasi 150-175 Gy dapat menurunkan daya infeksi *P.berghei* pada mencit dengan ditunjukkan oleh periode prepaten yang panjang serta jumlah kematian mencit yang rendah. Keberadaan *Plasmodium* dideteksi menggunakan nested-Polymerase Chain Reaction. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mendeteksi keberadaan *Plasmodium* iradiasi pada organ (hati dan limpa) mencit menggunakan metode Nested-Polymerase Chain Reaction (PCR). Penelitian ini menggunakan *Plasmodium* yang diiradiasi dosis 175 Gy tanpa booster, 175 Gy dengan booster, dan 0 Gy dan diinfeksi ke dalam tubuh mencit. Setelah 2 bulan hati dan limpa mencit diambil dan dilakukan ekstraksi DNA. Hasil ekstraksi diamplifikasi menggunakan nested-PCR dan dianalisis menggunakan gel agarosa dengan melihat ada tidaknya pita DNA spesifik yang berukuran sesuai dengan DNA target. *P. berghei* iradiasi tidak terdeteksi pada hati dan limpa mencit yang diinfeksi *P. berghei* dosis 175 Gy tanpa booster maupun dengan booster. Hal ini berarti bahwa iradiasi dapat menurunkan daya infeksi *P. berghei* di hati dan limpa mencit.

Abstract

Plasmodium berghei is parasite of protozoa that was causing malaria in rodent infected through bites of female *Anopheles* mosquito. Irradiation can cause changing protein structure, protein degradation also DNA conformation. Irradiation dose in 150-175 Gy can decrease infection of *P.berghei* in mice were showed by long prepaten period and low death in mice. *Plasmodium* detected by nested-Polymerase Chain Reaction. The purpose of this study to detect irradiation *Plasmodium* in the organs(liver and spleen) of mice using nested-Polymerase Chain Reaction method. This study used *Plasmodium* irradiated in 175 Gy dose without booster, 175 Gy with booster and 0 Gy dose then infected to the mice. After 2 months hepar and spleen of mice taken and doing DNA extraction. DNA extracts amplified using nested-PCR and analyzed using gel agarose electrophoresis by looking at the presence or absence of specific DNA bands corresponding to the size of the target DNA. *P. berghei* irradiation was not detected in the liver and spleen infected *P. berghei* 175 Gy dose without booster or 175 Gy with booster. It is mean that Irradiation can decrease infectivity of *P. berghei* in liver and spleen of mice.

© 2013 Universitas Negeri Semarang

✉ Alamat korespondensi:

Gedung D6 Lt.1, Jl. Raya Sekaran,
Gunungpati, Semarang, Indonesia 50229
E-mail: martawintana1012@gmail.com

PENDAHULUAN

Malaria merupakan penyakit yang disebabkan oleh parasit jenis protozoa dari genus *Plasmodium*. Salah satunya adalah *Plasmodium berghei* yang ditularkan melalui gigitan nyamuk *Anopheles* betina (Shi *et al.* 2007). *P. berghei* mempunyai siklus hidup dan morfologi yang sama dengan jenis *Plasmodium* yang menyebabkan malaria pada manusia.

Infeksi *Plasmodium* dapat menimbulkan anemia karena merozoit mengingesti sitoplasma eritrosit hospes dan mengubah hemoglobin menjadi asam amino dan pigmen hemozoin. Pigmen yang dihasilkan oleh *Plasmodium* menyebabkan perubahan pada hati dan limpa menjadi coklat kehitaman (Brown 1979). Infeksi *Plasmodium* dapat menyebabkan pembesaran limpa jika dilihat secara makroskopis sedangkan secara mikroskopis terdapat peningkatan jumlah sel makrofag dan pigmen yang tersebar (Wijayanti *et al.* 2003).

Penggunaan sinar gamma sudah banyak dilakukan untuk melemahkan sifat patogen suatu mikroorganisme. Radiasi pengion berinteraksi dengan sistem seluler melalui perubahan struktur, fungsi, dan respon sel terhadap produk seluler. Efek tidak langsung iradiasi gamma menyebabkan air terhidrolisis menghasilkan radikal bebas yang akan merusak sel termasuk DNA pada sel. Interaksi radiasi dengan DNA menyebabkan kerusakan DNA seperti *single strand break* (SSB), *double strand break* (DSB), *base damage* (BD) dan lain-lain (Nikjoo 2003).

Dosis radiasi optimal untuk melemahkan *P. falciparum* stadium sporozoit adalah antara 150–200 Gy dan telah dibuktikan dengan adanya imunitas protektif pada hewan coba setelah diimunisasi sporozoit *P. falciparum* dan *P. berghei* iradiasi (Hoffman *et al.* 2002). Dosis iradiasi 150-175 Gy dapat menurunkan daya infeksi *P. berghei* pada mencit dengan ditunjukkan oleh periode prepaten yang panjang serta jumlah kematian mencit yang rendah (Darlina & Tetriana 2008).

Penurunan daya infeksi *Plasmodium* diuji menggunakan teknik *nested-Polymerase Chain*

Reaction (PCR). *Nested-PCR* merupakan modifikasi dari PCR yang bertujuan mengurangi kontaminasi produk PCR yang disebabkan oleh kesalahan amplifikasi primer. *Nested-PCR* melibatkan dua pasang primer yang digunakan dalam dua proses PCR yang berurutan. Set primer kedua digunakan untuk memperkuat DNA target PCR *nested-1* dan menghasilkan DNA target yang lebih pendek dari produk PCR pertama (Neumaier *et al.* 1998).

Selain keakuratan yang tinggi, sensitivitas dari metode *nested-PCR* juga tinggi seperti penelitian Saiwichai *et al.* (2009) yang menggunakan pemeriksaan darah segar untuk mendeteksi *P. gallinaceum*. Tingkat sensitivitas yang didapatkan adalah sebesar 0.0000085% parasitemia atau 0,2 sel darah merah terinfeksi/ μ l. Penelitian Iqbal *et al.* (1999) menunjukkan bahwa metode PCR lebih optimal dibandingkan pemeriksaan mikroskopis. Berdasarkan uraian di atas maka akan dilakukan penelitian tentang uji daya infektivitas *P. berghei* iradiasi pada hati dan limpa menggunakan *nested-PCR*.

METODE PENELITIAN

Penelitian dilakukan dengan menggunakan dosis radiasi 0 Gy dan 175 Gy. Dosis 175 Gy dapat menurunkan daya infeksi *P. berghei* pada mencit. Hati dan limpa diambil dari mencit yang telah diinfeksi *P. berghei* 0 Gy satu kali suntikan, dosis 175 Gy satu kali suntikan dan dosis 175 Gy dua kali suntikan (*booster*). Bagian organ yang diuji diambil dari 3 titik yang berbeda dan dianggap sebagai 3 kali ulangan. Kontrol yang digunakan adalah ekstrak DNA *P. berghei* yang didapatkan dari Laboratorium Malaria, Lembaga Biologi Molekuler Eijkman Jakarta.

Isolasi DNA dilakukan menggunakan kit QIAGEN. Hasil isolasi DNA dielektroforesis gel agaros 2%. Sampel kemudian diamplifikasi *nested-1*. Hasil PCR *nested-1* dielektroforesis gel agaros 2%. Hasil amplifikasi pada *nested-1* mempunyai ukuran DNA target yaitu sebesar 1640 bp (Michael 2005). Gen targetnya adalah 50S ribosomal protein L21. Hasil amplifikasi

yang diperoleh pada *nested-1* dilanjutkan amplifikasi *nested-2*. PCR *nested-2* digunakan untuk memperkuat wilayah amplifikasi pada *nested-1*. DNA target pada PCR *nested-2* mempunyai ukuran sebesar 240 bp (Singh *et al.*1999). Gen targetnya adalah 50S ribosomal protein L21. PCR *nested-1* dan *nested-2* mempunyai gen target sama yaitu 50S ribosomal protein L21 karena *nested-PCR* adalah PCR bersarang yaitu daerah produk PCR *nested-2* berada di dalam produk PCR *nested-1*. Produk PCR *nested-1* merupakan daerah genus *Plasmodium* sedangkan produk PCR *nested-2* adalah spesifik daerah spesies.

PCR *nested-1* menggunakan primer rPLU1 sebagai primer F dengan urutan basa 5'-TCA AAG ATT AAG CCA TGC AAG TGA-3' sedangkan rPLU 5 sebagai primer R dengan urutan basanya adalah 5'-CCT GTT GTT GCC TTA AAC TCC-3'. Pada *nested-2*, rPLU3 sebagai primer F mempunyai urutan basa 5'-TTT TTA TAA GGA TAA CTA CGG AAA AGC TGT-3' sedangkan rPLU4 sebagai primer R mempunyai basa dengan urutan 5'-TAC CCG TCA TAG CCA TGT TAG GCC ATT ACC-3'.

Kondisi PCR untuk *nested-1*: a) Pre denaturasi pada suhu 94°C selama 4 menit, b) Siklus sebanyak 29 kali terdiri denaturasi pada suhu 94°C selama 30 detik, annealing pada suhu 55°C selama 1 menit, dan elongasi pada suhu 72°C selama 1 menit, c) Post elongasi pada suhu 72°C selama 4 menit. Kondisi untuk *nested-2* adalah pre denaturasi pada suhu 94°C selama 4 menit, siklus sebanyak 30 kali terdiri dari denaturasi pada suhu 94°C selama 30 detik, annealing pada suhu 62°C selama 1 menit, dan elongasi pada suhu 72°C selama 1 menit dan post elongasi pada suhu 72°C selama 4 menit.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Teknik *nested-PCR* telah banyak digunakan pada penelitian penyebab penyakit infeksi seperti *Plasmodium* (Sulistyaningsih 2007). DNA diperiksa menggunakan teknik elektroforesis yang akan menunjukkan migrasi pita DNA pada gel dalam larutan penyangga.

DNA berkualitas baik ditunjukkan oleh pita yang kompak dan tidak terdapat *smear*. *Smear* merupakan DNA yang terpotong-potong dan berukuran kecil. *Smear* juga dapat disebabkan oleh kemurnian DNA hasil isolasi yang rendah. Hasil pemeriksaan DNA dalam penelitian ini menunjukkan bahwa sebagian besar sampel terdapat *smear*. Salah satu sampel hati 0 Gy tidak terdapat DNA sehingga isolasi DNA pada sampel tersebut diulang kembali. Kualitas DNA akan mempengaruhi DNA target yang diinginkan.

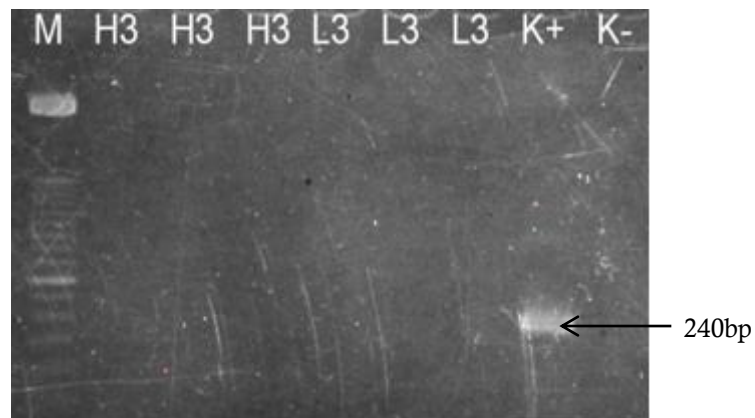
Hasil amplifikasi *nested-1* menunjukkan bahwa tidak ada pita yang muncul pada sampel setelah dielektroforesis. Pita hanya tampak pada marker sedangkan pada sampel dan kontrol positif tidak terdapat pendaran pita DNA target. Hal ini disebabkan komposisi mix PCR yang kurang tepat. Konsentrasi primer yang terlalu tinggi menyebabkan kesalahan penempelan sekuens DNA sehingga hasil amplifikasi tidak sesuai dengan yang diharapkan. Sebaliknya apabila konsentrasi primer yang digunakan terlalu rendah akan menyebabkan hasil amplifikasi yang didapatkan sangat sedikit (Muladno 2002). Komposisi *pre-mix* PCR yang digunakan antara *nested-1* dan *nested-2* mempunyai perbandingan yang sama, sedangkan DNA target antara keduanya berbeda. *Nested-1* mempunyai DNA target sebesar 1640bp sedangkan *nested-2* sebesar 240bp. Kurangnya komponen (pereaksi PCR, khususnya enzim Taq) untuk menyusun fragmen DNA berukuran 1640 bp menyebabkan tidak munculnya pita pada kontrol positif. Kontrol negatif menunjukkan bahwa hasil PCR tidak diperoleh pita sehingga dapat dipastikan tidak terjadi kontaminasi.

Tabel 1. Perubahan intensitas warna kuning telur burung puyuh yang diberi undur-undur laut

Organ yang diambil	Kode ampel	Ada/tidaknya pita DNA(240bp)	Ada tidaknya <i>P. berghei</i>
Marker	M	Ada	-
Hati 0 Gy	H1	Tidak	-
	H1	Tidak	-
	H1	Tidak	-
Limpa 0 Gy	L1	Tidak	-
	L1	Tidak	-
	L1	Tidak	-
Hati 175 Gy tanpa <i>booster</i>	H2	Tidak	-
	H2	Tidak	-
	H2	Tidak	-
Limpa 175Gy tanpa <i>booster</i>	L2	Tidak	-
	L2	Tidak	-
	L2	Tidak	-
Hati 175 Gy dengan <i>booster</i>	H3	Tidak	-
	H3	Tidak	-
	H3	Tidak	-
Limpa 175 Gy dengan <i>booster</i>	L3	Tidak	-
	L3	Tidak	-
	L3	Tidak	-
Kontrol positif	K+	Ada	+
Kontrol negatif	K-	Tidak	-

Keterangan: (+) = ada *P. berghei*

(-) = tidak ada *P. berghei*



Gambar 1. Hasil Amplifikasi PCR *nested-2* yang dielektroforesis gel agar 2%. M(Marker), H3(Hati iradiasi dosis 175 *booster*, L3(Limpa iradiasi dosis 175 *booster*), K+(Kontrol positif), K-(Kontrol negatif yang hanya berisi mix PCR)

Analisa data *nested-2* menunjukkan bahwa Meskipun *nested-1* pada kontrol positif tidak menunjukkan bahwa sampel hati maupun limpa muncul pita DNA tetapi setelah dilanjutkan tidak ada yang mengandung *P. berghei*. *nested-2* terdapat produk amplifikasi dengan

ukuran sebesar 240 bp. Dosis 0 Gy menunjukkan bahwa pada hati dan limpa mencit tersebut tidak mengandung *P. berghei*. Hal ini dimungkinkan karena tidak diketahui secara pasti jumlah *P. berghei* iradiasi yang diinfeksi ke dalam tubuh nyamuk karena penginfeksian dalam bentuk isolat tubuh nyamuk. Isolat yang diinfeksi ke dalam tubuh mencit mengandung sedikit *P. berghei* seperti penelitian Michael (2005) yaitu berjumlah < 200 parasit/ μ l. Jumlah parasit yang sedikit sehingga dimungkinkan hilang pada waktu proses isolasi DNA. Selain itu juga dimungkinkan mencit mengalami penyembuhan yang disebabkan oleh perbedaan variasi genetik, metabolisme, dan sistem imun masing-masing hospes (Miller *et al.* 2002)

Penelitian Wijayanti *et al.* (1997) mengungkapkan bahwa mencit yang mengalami penyembuhan banyak ditemukan parasit bentuk krisis atau degeneratif yaitu mulai mengecilnya sitoplasma dengan inti yang terlihat lebih gelap tetapi penelitian ini tidak memeriksa apus darah tepi. Parasit bentuk krisis pada pemeriksaan darah tepi menunjukkan bahwa respon imunitas seluler hospes teraktifkan. Makrofag yang teraktivasi akan mensekresi berbagai mediator toksik seperti *reactive oxygen intermediates* dan TNF (*Tumor Necrosis Factor*) yang dapat menyebabkan kematian parasit intraeritrositik. Makrofag berperan penting untuk mengeliminasi parasit karena kemampuannya untuk memfagositosis dan membunuh parasit baik secara oksidatif maupun non-oksidatif.

Kemampuan infeksi parasit juga dipengaruhi oleh cara infeksinya. Vaughan *et al.* (1999) menyatakan bahwa tingkat infeksi gigitan alami nyamuk lebih besar daripada melalui inokulasi intravena. Penelitian ini menggunakan infeksi intravena sehingga kemampuan infeksinya lebih rendah dibandingkan secara alami. Darah perifer merupakan tempat pertama masuknya *P. berghei* ke dalam tubuh manusia yaitu dalam bentuk sporozoit. Sel-sel dari sistem imun *innate* adalah pertahanan tubuh pertama yang melawan mikroorganisme. Setelah terjadi fagositosis, antigen akan diproses dan muncul peptida *major histocompatibility complex* (MHC)

(Schmidt 2011). Sebagian sporozoit yang lolos akan menuju ke organ hati. Sporozoit masuk ke dalam lumen sinusoidal searah atau melawan aliran darah. Sporozoit ini dapat menyerang sel *Kupffer*. Sel *Kupffer* adalah makrofag yang ada di dalam hati. Jika berhasil melewati sel *Kupffer* sporozoit akan melewati ruang *Disse* untuk menginfeksi hepatosit. Iradiasi yang diberikan membuat sporozoit lemah sehingga sulit untuk melawan sel *Kupffer* (Frevert *et al.* 2005).

Selain hati, limpa digunakan untuk identifikasi adanya infeksi *Plasmodium*. Limpa berfungsi melawan antigen yang berada di darah. Limpa akan membuang bahan partikel asing dan sel darah yang tua atau rusak. Sel darah yang terinfeksi akan dihancurkan oleh sistem imun di limpa. *Plasmodium* mempunyai sistem pertahanan untuk menghindari sistem imun limpa. *Plasmodium* yang lolos dari sistem imun limpa menyebabkan oklusi pembuluh darah di dalam limpa sehingga limpa akan membesar (Mohanty *et al.* 2005).

DNA *P. berghei* tidak diiradiasi ditemukan di dalam limpa 5 jam setelah infeksi, tetapi dalam waktu 25 jam intensitasnya berkurang karena parasit ini telah dihancurkan oleh sel-sel makrofag limpa (Ferreira *et al.* 1986). Limpa merupakan tempat berkumpulnya limfosit-limfosit aktif yang masuk ke dalam darah. Limpa memberikan reaksi yang cepat terhadap antigen yang dibawa oleh APC (*Antigen Presenting Cell*) dalam darah. Limpa berfungsi sebagai organ aktivasi sistem imun adaptif oleh sebab itu limpa merupakan filter imunogenik dari sistem sirkulasi (Iskandar *et al.* 2006).

Pembesaran limpa merupakan petunjuk adanya infeksi *Plasmodium*. Selain itu infeksi menyebabkan perubahan warna hati dan limpa menjadi coklat kehitaman karena parasit mengeluarkan pigmen hemozoin. Hemozoin merupakan produk detoksifikasi parasit yang dilepaskan ke dalam peredaran darah ketika eritrosit terinfeksi sudah matang. Hemozoin digunakan oleh parasit untuk menghambat fungsi monosit dan tidak bisa berdiferensiasi menjadi sel dendritik (Schmidt 2011). Sampel yang digunakan baik hati maupun limpa dalam penelitian ini tidak mengalami pembesaran

ataupun perubahan warna menjadi gelap tetapi masih berwarna merah seperti hati dan limpa normal. Sampel hati dengan tanpa radiasi seharusnya mengalami hepatomegali dan splenomegali karena kemampuan infeksi parasit lebih tinggi dibandingkan dengan parasit yang diiradiasi (Darlina & D Tetriana, 2008).

Setiap penghancuran sel darah merah yang mengandung merozoit akan merangsang reaksi humoral dan seluler. Ini menyebabkan fagositosis *Plasmodium*, sel yang diinfeksi, pigmen, dan sisa sel-sel histiosit bebas dan makrofag dari sistem retikulo-endoteal khususnya limpa akan semakin membesar. Penimbunan pigmen oleh parasit selama pertumbuhan di eritrosit memberi warna kelabu pada organ hati dan ginjal (Brown 1979). Sedangkan pada sampel tidak menunjukkan adanya perubahan warna pada hati dan limpa. Hal ini disebabkan karena adanya sistem imun yang dimediasi oleh sel T yang dipicu oleh pemberian parasit iradiasi.

Sel T adalah sel di dalam salah satu grup sel darah putih yang diketahui sebagai limfosit dan memainkan peran utama pada kekebalan selular. Sel T mampu membedakan jenis patogen dengan kemampuan berevolusi sepanjang waktu demi peningkatan kekebalan setiap kali tubuh terpapar patogen. Sel T yang telah disintesis dari kelenjar timus disebut sel T CD4+, akan terbawa oleh sirkulasi darah hingga masuk ke dalam limpa dan bermigrasi ke dalam jaringan limfatik, kemudian bermigrasi kembali ke dalam sirkulasi darah, hingga suatu saat terjadi terstimulasi oleh antigen tertentu (Janeway *et al.* 2001). Sel ini menyerang sel tubuh yang terinfeksi dan sel pathogen yang relatif besar secara langsung.

Penggunaan sinar gamma untuk iradiasi parasit ini diharapkan mampu melemahkan infektivitas *P. berghei* di dalam siklus hidupnya dalam tubuh mamalia (Syiaifudin *et al.* 2008; Tetriana 2007). Iradiasi sinar gamma akan mengurangi kemampuan *Plasmodium* untuk melanjutkan siklus hidupnya. Tidak terdeteksinya *Plasmodium* pada hati dan limpa ini dapat disebabkan sel limfosit T yang berperan dalam respon imun tubuh terhadap

infeksi malaria. Setelah injeksi parasit pasca iradiasi gamma, *Plasmodium* akan mengalir bersama darah dan akan difagositosis oleh neutrofil. Neutrofil dapat memfagosit dan mempunyai lisosom yang mengandung asam hidrosilase dan peroksidase untuk membunuh mikroorganisme (Eales 1999). Kemampuan infeksi yang sudah dilemahkan atau jumlah parasit yang sedikit menyebabkan parasit tidak mampu masuk ke dalam sel-sel hati. Pada tahap ini siklus hidupnya terhenti sehingga tidak bisa terdeteksi pada hati dan limpa.

SIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian dan pembahasan dapat disimpulkan bahwa *P. berghei* iradiasi tidak terdeteksi pada hati dan limpa mencit menggunakan metode *nested*-PCR. Hal ini berarti bahwa iradiasi gamma efektif melemahkan atau menurunkan daya infeksi parasit.

DAFTAR PUSTAKA

- Brown HW. 1979. Dasar Patologi Klinis. Penerjemah: Bintari Rukmono, Hoedjo, Nani S. Djakaria, Siti Doemilah Soeprihatin, Sri S. Margono, Sri Oemijati, Srisasi Ganda husada, Wita Pribadi. Jakarta: Gramedia
- Darlina & Tetriana D. 2008. Daya infeksi *Plasmodium berghei* stadium eritrositik yang diiradiasi sinar gamma. *on line at*: www.batan.go.id [diakses tanggal 20 April 2012].
- Eales L. 1999. Immunology for lifescientist. Newyork: John Wiley & sons.
- Ferreira A, Enea V, Morimoto T, & Nussenzweig V. 1986. Infectivity of *Plasmodium berghei* sporozoites measured with a DNA probe. *Mol Biochem Parasitol* 19(2): 103-109.
- Frevert U, Sabine E, Sergine Z, Jorg S, Bruce Ng, Kai M, Leonard L & Yee H. 2005. Intravital observation of *Plasmodium berghei* infection of the liver. *PLoS Biology* 3(6): 1034-1046.
- Hoffman SL, Goh LML, Luke TC, Schneider I, Le TP, Doolan DL, Sachi J, Vega P de la, Dowler M, Paul C, Gordon DM, Stoute JA, Church LWP, Sedegah M, Heppener DG, Ballou WR, & Richie TL. 2002. Protection of humans against malaria by immunization with

- radiation-attenuated *Plasmodium falciparum* Sporozoites. *J Infect Diseases* 185(8): 1155-1164.
- Iqbal J, Ali S, Parsotam RH & Al-Owaish R. 1999. Comparison of the optimal test with PCR for diagnosis of malaria in immigrants. *Journal of Clinical Microbiology* 37(11): 3644-3646.
- Iskandar T, Subekti DT & Diani EF. 2006. Gambaran splenosit, limpa, dan kekebalan pada mencit galur BALB/C yang diberi allantoin dan diinfeksi *Toxoplasma gondii*. Dalam: Seminar Nasional Teknologi Peternakan dan Veteriner, Balai Penelitian Veteriner. Bogor.
- Janeway CA, Travers Jr P, Walport M & Shlomchik MJ. 2001. Immunobiology: The Immune System in Health and Disease. 5th edition, New York: Garland Science
- Michael JCR. 2005. *Plasmodium sp* infection in ex-captive Bornean orangutans (*Pongo pygmaeus*) housed at the orangutans care center and quarantine, Padang Panjang, Kalimantan Tengah, Indonesia. Thesis. Departement of Archaeology, Simon Fraser University.
- Mohanty S, Patel DK, Pati SS & Mishra SK. 2006. Adjuvant therapy in cerebral malaria. *Indian J Med Res* 124(3): 245.
- Muladno. 2002. Seputar Teknologi Rekayasa Genetika. Bogor: Pustaka Wirausaha Muda.
- Neumaier M, Braun A & Wagener C. 1998. Fundamentals of quality assessment of molecular amplification methods in clinical diagnostics. *Clinical Chemistry* 44(1):12-26.
- Nikjoo H. 2003. Radiation track and DNA damage. *Iran J Radiat Res* 1(1): 3 – 16.
- Saiwichai T, Maneepak M, Songprakhon P, Harnyuttanakorn P & Nithiuthai S. 2009. Species – specific nested PCR for detecting *Plasmodium gallinaceum* infresh chicken blood. *Top Mad Parasitol* 32:75-81.
- Schmidt KE. 2011. Analysis of parasite-specific T cells and cellular interactions in the spleen during *Plasmodium berghei* induced experimental cerebral malaria. (Disertasi). Germany: University of Bonn.
- Shi Q, Lynch MM, Romero M, & Burns JM. 2007. Enhanced protection against malaria by chimeric merozoite surface protein vaccine. *Infect and Immun* 75(3): 1349-1358.
- Singh B, Bobogare A, Cox-Singh J, Snounou J, Abdullah MS, & Rahman HA. 1999. A Genus- and species-specific nested Polymerase Chain Reaction malaria detection assay for epidemiologic studies. *The Amer Soc Tropical Med & Hyg* 60(4): 687-692.
- Sulistyaningsih E. 2007. *Polymerase Chain Reaction(PCR)*: Era baru diagnosis dan manajemen penyakit infeksi. *Laboratorium Fisiologi Fakultas Kedokteran Jember* 1(1): 16-25.
- Syaifudin M, Nurhayati S & Tetriana D. 2008. Pengembangan vaksin malaria dengan radiasi pengion. Makalah disampaikan pada *Seminar Nasional Sains dan Teknologi- II*. Universitas Lampung. Lampung 17-18 November 2008.
- Tetriana D. 2007. *Mengendalikan malaria dengan teknik nuklir*. Jakarta: Pusat Teknologi Keselamatan dan Metrologi Radiasi BATAN.
- Vaughan JA, Scheller LF, Wirtz RA, & Azad AF. 1999. Infectivity of *Plasmodium berghei* sporozoites delivered by intravenous inoculation versus mosquito bite: implications for sporozoite vaccine trials. *Infect & Immun* 67(8): 4285-4289.
- Wijayanti MA, Herdiana EM, Mardihusodo SY. 2003. Efek bee propolis terhadap infeksi *Plasmodium berghei* pada mencit Swiss. *Berkala Ilmu Kedokteran* 35(2): 81-89.