

Comparison of Cerebral Malaria Mice Models Infected by *P. berghei* ANKA

**Prawesty Diah Utami^{1*}, R. Varidianto Yudo Tjahjono²,
Indi Jazilah², Ismy Azizah Sisnawati³**

¹Departement of Parasitology, Faculty of Medicine,
Universitas Hang Tuah

Jl. Gadung no. 1 Komplek Barat RSAL dr. Ramelan Surabaya 60111. Jawa Timur.

² Faculty of Medicine, Universitas Hang Tuah

Jl. Gadung no. 1 Komplek Barat RSAL dr. Ramelan Surabaya 60111. Jawa Timur.

² Faculty of Medicine, Universitas Hang Tuah

Jl. Gadung no. 1 Komplek Barat RSAL dr. Ramelan Surabaya 60111. Jawa Timur.

*Corresponding author: prawesty.diah@hangtuah.ac.id

Abstract

*The high morbidity and mortality due to malaria infection makes it a global health problem. The pathogenesis and pathophysiology of cerebral malaria has not been fully understood. The use of cerebral malaria model mice is one alternative to understand its pathogenesis and pathophysiology. The purpose of this study was to compare Swiss mice and C57BL / 6 mice inoculated by *P.berghei* ANKA as a model of cerebral malaria mice. Methods: The study design was a randomized Post Test Control Only Group Design using 12 Swiss mice and 12 C57BL / 6 mice divided into 2 groups each: the treatment group inoculated by *P. berghei* ANKA and the control group without inoculation. Observation of clinical manifestations and parasitemia level was carried out from day 1 to day -10. The study results showed that K2 group showed a significant increase in the degree of parasitemia compared to K4. K4 group showed clinical manifestations of cerebral malaria while K2 did not show clinical manifestations of cerebral malaria. Conclusion: C57BL / 6 mice inoculated by PbA can be used as cerebral malaria animal models.*

Keywords: *P.berghei* ANKA, C57BL/6 mice, Swiss mice, Clinical manifestation, Parasitemia level.

Abstrak

Tingginya angka kesakitan dan kematian akibat infeksi malaria menjadikannya sebagai masalah kesehatan global. Patogenesis dan patofisiologi malaria serebral belum difahami secara menyeluruh. Penggunaan mencit model malaria serebral menjadi salah satu alternatif untuk memahami patogenesis dan patofisiologisnya. Tujuan penelitian ini adalah untuk membandingkan mencit swiss dan mencit C57BL/6 yang diinokulasi *P.berghei* ANKA sebagai model mencit malaria serebral. Metode : Rancangan penelitian randomized *post test control only group design* menggunakan 12 mencit swiss dan 12 mencit C57BL/6 yang terbagi masing-masing menjadi 2 kelompok : kelompok perlakuan yang diinokulasi *P.berghei* ANKA dan kelompok kontrol tanpa inokulasi. Pengamatan manifestasi klinis dan level parasitemia dilakukan mulai dari hari ke 1 - hari ke -10. Hasil penelitian menunjukkan bahwa kelompok K2 menunjukkan kenaikan derajat parasitemia yang signifikan dibandingkan K4. Kelompok K4 menunjukkan adanya

manifestasi klinis malaria serebral sedangkan K2 tidak menunjukkan manifestasi klinis malaria serebral. Kesimpulan: Mencit C57BL/6 yang diinokulasi PbA dapat dijadikan hewan model malaria serebral.

Kata kunci: *P.berghei* ANKA, mencitC57BL/6, mencit Swiss, manifestasi klinik, level parasitemia.

Pendahuluan

Malaria menyebabkan kematian dari satu juta orang setiap tahunnya, dan sebagian besar disebabkan oleh malaria serebral akibat infeksi dari *Plasmodium falciparum*. Diagnosis malaria serebral ditegakkan jika adanya gejala neurologis dan bentuk aseksual parasit malaria pada hapusan darah tepi(Sierro and Grau 2019). Terdapat 90% kasus malaria serebral pada anak-anak di sub-Saharan Afrika, sedangkan pada dewasa di wilayah Asia Tenggara memiliki angka kematian untuk malaria serebral sebesar 50%, sedangkan di Indonesia angka kematiannya sebesar 21,5% -30,5%(Nurhayati 2009; Storm and Craig 2014).Keberhasilan terapi malaria serebral terkait dengan pemahaman terhadap proses biologi perkembangan penyakit tersebut. Patogenesis dan patofisiologi malaria serebral masih belum terungkap jelas, disebabkan keterbatasan sampel otak hasil otopsi penderita malaria serebral yang sangat terbatas, sehingga sebagai alternatifnya, peneliti menggunakan hewan model malaria serebral, termasuk mencit model. Dari berbagai studi literatur didapatkan bahwa konsep – konsep dasar tentang malaria serebral di dapatkan dari penelitian menggunakan mencit coba(Souza, Hafalla, and Riley 2009).

Plasmodium berghei ANKA/PbA merupakan parasit malaria pada hewan pengerat yang sering digunakan untuk menginokulasi mencit model malaria serebral. Patogenesis dan patofisiologi pada mencit yang diinfeksi oleh PbA menunjukkan kesamaan dengan infeksi malaria serebral pada manusia, Penggunaan model malaria serebral juga harus memperhatikan jenis spesies mencit

yang diinokulasi oleh PbA(Doolan 2002; Janse 2016). Studi sebelumnya menyatakan bahwa mencit C57BL/6 sangat rentan terhadap inokulasi PbA, sehingga sangat cocok digunakan sebagai hewan model malaria serebral(Blanco *et al.* 2008; Oakley *et al.* 2008).Inokulasi PbA pada mencit C57BL/6tersebut dapat menyebabkan munculnya manifestasi klinis malaria serebral pada hari ke-6 sampai dengan hari ke-12 post inokulasi PbA(Martins *et al.* 2009).Mencit swiss outbred telah lama digunakan dalam penelitian eksperimental malaria serebral, tetapi laporan penggunaannya dalam studi malaria serebral sangat terbatas dan deskripsi infeksi PbA dalam mencit swiss ini kurang memiliki rincian tentang perjalanan infeksi serta perubahan histopatologis jaringan otaknya. Dalam penelitian ini, kami mencoba menggunakan mencit swiss inbreed yang diinokulasi dengan PbA, untuk membuktikan apakah mencit swiss inbreed ini dapat digunakan sebagai hewan model malaria serebral dan membandingkan manifestasi klinis dan level parasitemia dari hari ke-1 sampai dengan hari ke-10 dengan mencit C57BL/6 yang diinokulasi dengan PbA juga.

Metode

Penelitian ini merupakan *true experimental study* dan desain penelitian yang digunakan adalah *Post Test Control Only Group Design* yang telah disetujui oleh komite etik penelitian FK Hang Tuah Surabaya. Jumlah sampel penelitian ini dihitung menggunakan rumus Federer dengan 4 kelompok penelitian yang masing – masing kelompok terdiri dari 6 ekor mencit sehingga didapatkan 24 mencit.Sampel 24 mencit terdiri dari 12 mencit C57BL/6 betina dan 12 mencit swiss betina dan dikelompokkan sebagai berikut :

1. Kelompok 1/K1 : 6 ekor mencit swiss betina yang tidak diinokulasi PbA
2. Kelompok 2/K2 : 6 ekor mencit swiss betina yang diinokulasi PbA

3. Kelompok 3/K3 : 6 ekor mencit C57BL/6 yang tidak diinokulasi PbA

4. Kelompok 4/K4 : 6 ekor mencit C57BL/6 yang diinokulasi PbA

Mencit swiss didapatkan dari Universitas Gajah Mada dan mencit C57BL/6 didapatkan dari PT. Indoanilab Bogor dengan berat sekitar 15 – 20 gram dan berusia 7 – 10 minggu. PbA didapatkan dari laboratorium parasitologi klinik FK Universitas Brawijaya Malang. Pada kelompok K2 dan K4 diinokulasi dengan 0.2 ml eritrosit yang mengandung 1×10^6 PbA secara intraperitoneal (Adetutu *et al.* 2016).

Inokulasi PbA

Proses aklimatisasi dan adaptasi mencit coba berlangsung selama 7 hari, kemudian dilakukan randomisasi untuk penentuan mencit di masing – masing kelompok penelitian. Pada kelompok perlakuan (K2 dan K4) dilakukan proses inokulasi sebagai berikut : Darah yang mengandung $\pm 10^6$ parasit PbA diinokulasikan terhadap 6 ekor mencit donor, masing – masing 0,2 ml secara intra peritoneal. Setelah proses inokulasi dilanjutkan dengan pengamatan derajat parasitemia setiap hari untuk mengetahui perkembangan parasit. Ketika derajat parasitemia mencapai 30 – 40%, mencit donor dimatikan menggunakan injeksi ketamine-xylazine secara intraperitoneal dan dilakukan pengambilan darah melalui pungsi jantung menggunakan spuit 3 ml dengan jarum spuit ukuran 22. Dari masing – masing mencit didapatkan sekitar 1,2 – 1,5 ml darah, kemudian dimasukkan ke tabung reaksi dengan heparin (darah:heparin = 90%:10%). Semua darah dicampur supaya homogen jumlah parasitnya. Darah tersebut diinokulasikan ke masing – masing mencit pada K2 dan K4 menggunakan spuit 1 ml, masing – masing 0,2 ml secara intra peritoneal (Baeti 2010).

Pemeriksaan Derajat Parasitemia

Pengamatan tingkat parasitemia dilakukan serial setiap hari mulai hari ke-1 – hari ke-10 post inokulasi PbA. Teknik tetes tipis digunakan untuk menghitung jumlah eritrosit yang terinfeksi dibagi dengan 1000 eritrosit dikalikan 100% menggunakan mikroskop binokular dan pewarnaan Giemsa. Tata cara pemeriksaan derajat parasitemia dimulai dengan proses desinfeksi dengan alkohol pada ujung ekor mencit, dilanjutkan dengan pemotongan pada ujung ekor mencit menggunakan gunting steril. Setelah ujung ekor dipotong dilanjutkan dengan menekan ujung ekor untuk meneteskan darah diatas gelas obyek, dilakukan hapusan dengan gelas obyek yang lain, dan dikeringkan pada suhu kamar. Proses pewarnaan dimulai dengan menggenangi obyek glass dengan giemsa $\pm$ 45 menit, dicuci pada air mengalir, dikeringkan pada suhu kamar. Pengamatan parasit di dalam eritrosit menggunakan mikroskop dengan pembesaran obyektif 100x dan pembesaran okular 10x. Memilih area hapusan darah tepi dengan pengecatan *giemsa* dimana eritrosit terdistribusi dengan baik, menghitung semua eritrosit pada seluruh lapangan pandang dan tanpa menggeser sediaan sampai eritrosit yang terhitung mencapai 100 eritrosit. Dilakukan pengulangan penghitungan eritrosit minimal 2x dan pengamatan dilakukan pada 10 lapangan pandang dan didapatkan jumlah rata-rata eritrosit yang terinfeksi per 1000 eritrosit kali 100 % (Baeti 2010; Adetutu *et al.* 2016). Pengamatan dilakukan oleh dua orang yang berbeda dan dilakukan penghitungan nilai rata – rata pengamatan derajat parasitemia antara dua pengamatan. Jenis skala data yang didapatkan dari pemeriksaan kadar parasitemia adalah rasio.

Pengamatan Manifestasi Klinis

Pengamatan manifestasi klinis malaria serebral dilakukan mulai dari hari ke-1 sampai dengan hari ke-10 post inokulasi PbA. Pengamatan manifestasi klinis dengan pemberian skor oleh (Waknine-Grinberg *et al.* 2010) yang telah dimodifikasi oleh (Runtuk, Fitri, and Noviyanti 2018):

Tabel 1 Skoring Penilaian Manifestasi Klinis Malaria Serebral

	Tanda Klinis	Skor
Keadaan bulu	Normal	0
	Kusut	1
Perilaku	Normal	0
	Postur membungkuk	1
	Imobilisasi atau parsial paralisis	2
	Koma, kejang	3
Suhu tubuh	Normal	0
	Menggigil	1

Penilaian skoring manifestasi klinis dilakukan dengan menjumlahkan skor tiap poin penilaian yang dilakukan oleh dua orang yang berbeda. Skor akhir merupakan nilai rata – rata hasil pengamatan antara pengamat 1 dan 2. Mencit yang memiliki skor ≥ 4 dianggap menderita serebral malaria (Runtuk, Fitri, and Noviyanti 2018).

Setelah dilakukan pengamatan gejala klinis malaria serebral dan telah dilakukan perhitungan derajat parasitemia, mencit dari semua kelompok dilakukan terminasi, dengan cara membiusnya dengan ketamine-xylazine secara intraperitoneal (Leary *et al.* 2013; Einstein 2015), kemudian dilakukan diseksi thorax untuk mengambil darahnya secara intrakardiak. Setelah dilakukan terminasi sesuai protokol, lalu sisa tubuh mencit dikirim ke insenerator untuk dimusnahkan (Darmawan 2014).

Analisis Data

Dari hasil penelitian, data dianalisis dengan menggunakan tingkat kemaknaan yang digunakan pada penelitian ini sebesar 5 %. Data dianalisis secara deskriptif dan statistik parametrik Kruskal wallis dan Mann Whitney U karena data tidak terdistribusi normal dan homogen.

Hasil dan Diskusi

Data pemeriksaan derajat parasitemia menunjukkan bahwa data tidak berdistribusi normal sehingga analisis menggunakan Kruskal Wallis, dan data hasil pemeriksaan dapat dilihat pada tabel dibawah ini :

Tabel 2 Analisis Deskriptif dan Statistik Penghitungan Derajat Parasitemia Hari 1-10

Kelompok	NILAI RERATA PENGHITUNGAN DERAJAT PARASITEMIA (%)									
	Hari 1	Hari 2	Hari 3	Hari 4	Hari 5	Hari 6	Hari 7	Hari 8	Hari 9	Hari 10
K1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
K2	0.00	0.00	0.22	0.65	2.85	4.58	5.72	12.03	12.96	14.40
K3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
K4	0.00	0.00	0.27	1.18	2.03	2.43	6.50	2.68	1.67	1.83
Analisis Kruskal Wallis; Nilai p =	1.00	1.00	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*
Analisis Mann Whitney K1-K2 Nilai p =	1.00	1.00	0.002*	0.002*	0.002*	0.002*	0.002*	0.002*	0.002*	0.002*
Analisis Mann Whitney K1-K3 Nilai p =	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
Analisis Mann Whitney K1-K4 Nilai p =	1.00	1.00	0.002*	0.002*	0.002*	0.002*	0.002*	0.002*	0.002*	0.002*
Analisis Mann Whitney K2-K3 Nilai p =	1.00	1.00	0.002*	0.002*	0.002*	0.002*	0.002*	0.002*	0.002*	0.002*
Analisis Mann Whitney K2-K4 Nilai p =	1.00	1.00	0.699	0.132	0.093	0.026*	0.394	0.015	0.002*	0.002*
Analisis Mann Whitney K3-K4 Nilai p =	1.00	1.00	0.002*	0.002*	0.002*	0.002*	0.002*	0.002*	0.002*	0.002*

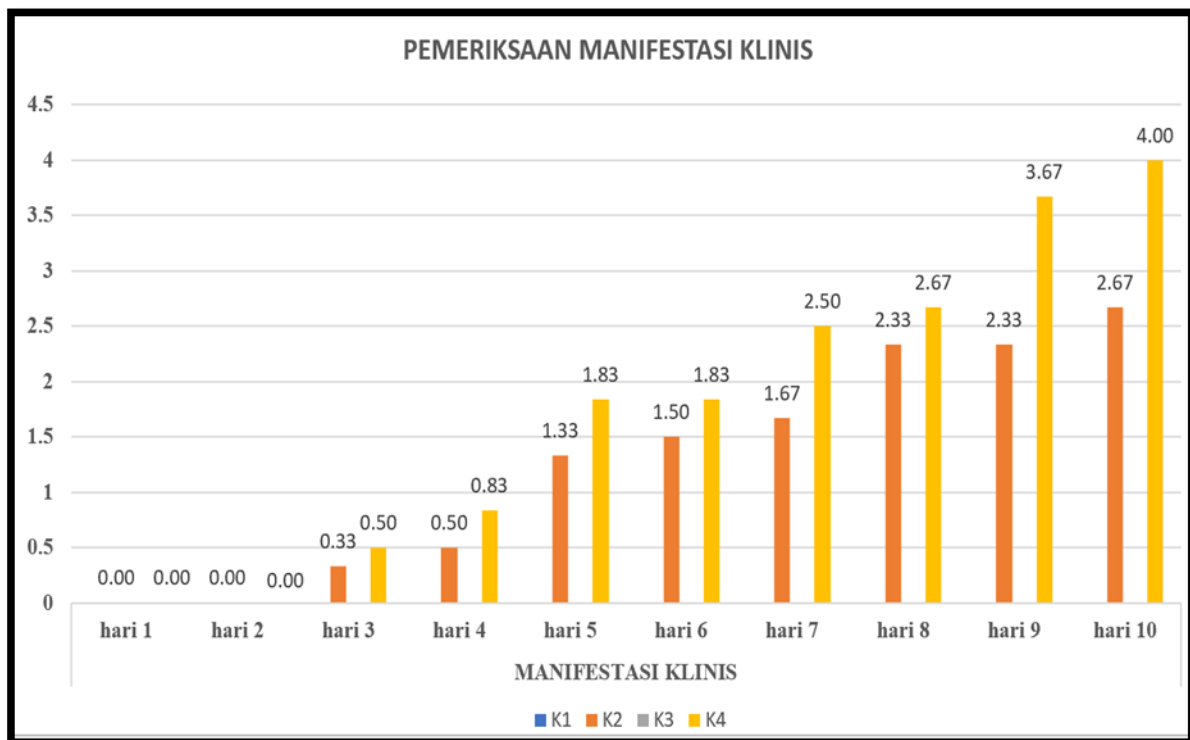
Tanda *: nilai p < 0.05, menunjukkan perbedaan yang signifikan

Hasil analisis statistik dan deskriptif pada tabel diatas menunjukkan bahwa pengamatan hari ke-1 dan ke -2 post inokulasi PbA pada semua kelompok

menunjukkan tidak adanya perbedaan yang signifikan. Hal ini berarti pada hari ke-1 dan ke-2 belum terjadi pertumbuhan parasit post proses inokulasi PbA sehingga antara kelompok kontrol K1 dan K3 dengan kelompok perlakuan K2 dan K4 sama derajat parasitemianya. Pada hari ke 3 sampai dengan hari ke-10 telah menunjukkan perbedaan yang signifikan antara kelompok kontrol K1 dan K3 dengan kelompok perlakuan K2 dan K4. Hal ini disebabkan karena pada kelompok perlakuan dilakukan proses inokulasi PbA sehingga pada hari ke-3 sampai dengan hari ke-10 telah menunjukkan progresifitas perkembangan parasit dalam sirkulasi darah. Proses inokulasi intravena dari skizon ***P.berghei*** ANKA yang matur akan menghasilkan multiplikasi aseksual yang sinkron selama 2 siklus (dari stadium trofozoit / *ring form* sampai terbentuk *ring form* lagi)(Franke-fayard *et al.* 2010; Janse 2016), perkembangan parasit dalam eritrosit ini yang menyebabkan kenaikan derajat parasitemia pada kelompok yang diinokulasi PbA.

Derajat parasitemia antara K2 dan K4 juga menunjukkan perbedaan yang signifikan, dimana pada hari ke-3 dan ke -4 derajat parasitemia K4 lebih tinggi dari K2; pada hari ke-5, hari ke-7 sampai hari ke-10 derajat parasitemia K2 lebih tinggi dari K4. Derajat parasitemia K4 menunjukkan pola penurunan sejak hari ke-8 dan ke-10, tetapi pola perkembangan derajat parasitemia K2 selalu menunjukkan pola peningkatan dari hari ke-3 sampai ke-10. Penurunan derajat parasitemia pada K4 kemungkinan berhubungan dengan sekuestrasi eritrosit pada sel endotel vaskular jaringan lainnya seperti hepar, lien, paru – paru, ginjal dan otak, sehingga eritrosit yang terinfeksi ditemukan dalam jumlah yang kecil di sirkulasi darah(Franke-fayard *et al.* 2005).

Data pemeriksaan manifestasi klinis malaria serebral menunjukkan bahwa data tidak berdistribusi normal sehingga analisis menggunakan Kruskal Wallis, dan data hasil pemeriksaan dapat dilihat pada gambar dibawah ini :



Gambar 1 Diagram Nilai Rerata Skoring Pemeriksaan Manifestasi Klinis Malaria Serebral

Pengamatan manifestasi klinis pada gambar diatas menunjukkan bahwa pada hari 1-2 belum menunjukkan perbedaan manifestasi klinis, pada setiap kelompok menunjukkan skor 0. Pada hari ke-3 sampai dengan hari ke-10 telah menunjukkan manifestasi klinis pada K2 dan K4, sedangkan kelompok kontrol (K1 dan K3) tetap tidak menunjukkan manifestasi klinis. Skor manifestasi klinis pada kelompok K2 menunjukkan skor kurang dari 4 sehingga dapat disimpulkan bahwa mencit pada kelompok K2 tidak menderita malaria serebral, namun munculnya manifestasi klinis lebih disebabkan karena efek pecahnya eritrosit sehingga menyebabkan penurunan jumlah eritrosit. Skor manifestasi klinis K4 hari ke-3 sampai ke-9 menunjukkan skor <

4, tetapi pada hari ke-10 menunjukkan rerata skor 4 yang berarti mencit pada K4 telah mengalami malaria serebral.

Hasil analisis statistik uji beda terhadap manifestasi klinis malaria serebral dapat dilihat pada tabel berikut :

**Tabel 3 Analisis Statistik Manifestasi Klinis Malaria Serebral
Pada Hari Ke-1 – Hari Ke-10**

Kelompok	NILAI RERATA SKORING PENGAMATAN MANIFESTASI KLINIS									
	Hari 1	Hari 2	Hari 3	Hari 4	Hari 5	Hari 6	Hari 7	Hari 8	Hari 9	Hari 10
Analisis Kruskal Wallis Nilai p =	1.00	1.00	0.088	0.005*	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*
Analisis Mann Whitney K1-K2 Nilai p =	1.00	1.00	0.394	0.180	0.002*	0.002*	0.002*	0.002*	0.002*	0.002*
Analisis Mann Whitney K1-K3 Nilai p =	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
Analisis Mann Whitney K1-K4 Nilai p =	1.00	1.00	0.180	0.015*	0.002*	0.002*	0.002*	0.002*	0.002*	0.002*
Analisis Mann Whitney K2-K3 Nilai p =	1.00	1.00	0.394	0.180	0.002*	0.002*	0.002*	0.002*	0.002*	0.002*
Analisis Mann Whitney K2-K4 Nilai p =	1.00	1.00	0.699	0.394	0.180	0.394	0.065	0.589	0.015*	0.002*
Analisis Mann Whitney K3-K4 Nilai p =	1.00	1.00	0.180	0.015*	0.002*	0.002*	0.002*	0.002*	0.002*	0.002*

Tanda *: nilai $p < 0.05$, menunjukkan perbedaan yang signifikan

Hasil analisis statistik uji beda juga menunjukkan bahwa terdapat perbedaan yang signifikan antara kelompok kontrol (K1 dan K3) dengan kelompok perlakuan (K2 dan K4), perbedaan antara K1 dan K3 dengan K2 muncul saat hari ke-5 dan

perbedaan manifestasi klinis dengan K4 muncul lebih awal yaitu pada hari ke-4 post inokulasi PbA, Manifestasi klinis pada K2 juga lebih rendah signifikan dibandingkan K4 pada hari ke-9 dan ke-10, meskipun secara deskriptif rerata skor K4 selalu lebih tinggi dari K2 mulai dari hari ke-3 sampai ke-10. Tidak ada perbedaan manifestasi klinis antara kelompok kontrol yaitu K1 dan K3.

Tingginya skor manifestasi klinis malaria serebral pada kelompok K4 dikaitkan dengan mekanisme patogenesis malaria serebral. Munculnya gejala pada malaria diawali oleh tingginya derajat parasitemia, dikeluarkannya berbagai molekul PAMP oleh PRBC yang akan menginduksi respon imun innate maupun adaptif. Pelepasan berbagai sitokin proinflamasi oleh respon imun innate maupun adaptif akan memicu munculnya gejala sistemik pada malaria. Munculnya gejala sistemik dipicu oleh pelepasan berbagai mediator inflamasi seperti sitokin proinflamasi disekresikan oleh imunitas innate sebagai respon pengenalan terhadap *pathogen associated molecular pattern* (PAMP) atau *damage associated molecular pattern* oleh (DAMP) oleh *pattern recognition receptor* (PRR) (Evans et al. 2016). Skor manifestasi klinis pada kelompok K2 tidak mencerminkan manifestasi klinis malaria serebral, tapi disebabkan penurunan eritrosit akibat proses hemolisis yang dipicu oleh progresifitas perkembangan parasit dalam eritrosit.

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa mencit swiss inbreed yang diinokulasi PbA tidak dapat menjadi mencit model malaria serebral, karena sampai dengan hari terakhir pengamatan manifestasi klinis malaria serebral tidak ditemukan. Namun mencit ini dapat digunakan sebagai model malaria dengan anemia berat karena perkembangan derajat parasitemia yang progresif berhubungan dengan makin tingginya eritrosit yang pecah. Mencit C57BL/6 yang diinokulasi PbA membuktikan adanya perkembangan parasit meskipun tidak progresif seperti mencit swiss, dan di

hari akhir pengamatan memperlihatkan adanya manifestasi klinis malaria serebral. Hasil penelitian ini telah membuktikan bahwa mencit C57BL/6 yang diinokulasi PbA terbukti dapat menjadi hewan model untuk penelitian malaria serebral.

Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa mencit swiss inbreed yang diinokulasi PbA tidak dapat menjadi model malaria serebral, namun mencit C57BL/6 yang diinokulasi PbA dapat menjadi model malaria serebral.

References

- Adetutu, Adewale, Olubukola S. Olorunnisola, Abiodun O. Owoade, and Peter Adegbola. 2016. "Inhibition of In Vivo Growth of Plasmodium Berghei by Launaea Taraxacifolia and Amaranthus Viridis in Mice." *Malaria Research and Treatment* 2016 (1): 1–9. <https://doi.org/10.1155/2016/9248024>.
- Baeti, Devi Nurul. 2010. *Efek Terapi Kombinasi Klorokuin Dan Serbuk Lumbricus Rubellus Terhadap Ekspresi Gen ICAM 1 Pada Mencit Swiss Yang Diinfeksi P. Berghei* ANKA. Fakultas Kedokteran Sebelas Maret.
- Blanco Yara , Farias Alessandro, Goelnitz Uta, Amino Rogério Lopes Stefanie , Arrais-Silva Wagner , Carvalho Bruna, and Costa Fabio Wunderlich Gerhard, Santos Leonilda, Giorgio Selma. 2008. "Hyperbaric Oxygen Prevents Early Death Caused by Experimental Cerebral Malaria." *PLoS ONE* 3 (9): 2–11. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003126>.
- Doolan, Denise L. 2002. *Methods and Protocols Edited By. Humana Press Inc.* Totowa.
- Einstein, Medicine College of Albert. 2015. "Recommended Methods of Anesthesia , Analgesia , and Euthanasia for Laboratory Animal Species." In *Laboratory Animal*, 1:1–12.
- Evans, Sharon S, Elizabeth A Repasky, and Daniel T Fisher. 2016. "Fever and the Thermal Regulation of Immunity: The Immune System Feels the Heat." *Nature Reviews Immunology* 15 (6): 335–49. <https://doi.org/10.1038/nri3843>.
- Franke-fayard, Blandine, Jannik Fonager, Anneke Braks, Shahid M Khan, and Chris J Janse. 2010. "Sequestration and Tissue Accumulation of Human Malaria Parasites: Can We Learn Anything from Rodent Models of Malaria? Sequestration and Tissue Accumulation of Human Malaria Parasites: Can We Learn Anything from Rodent Models of Malaria?," no. June 2017. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1001032>.
- Franke-fayard, Blandine, Chris J Janse, Cunha R. Margarida, Jai Ramesar, Philippe Buscher, Ivo Que, Clemens Lowik, et al. 2005. "Murine Malaria Parasite Sequestration: CD36 Is the Major Receptor , but Cerebral Pathology Is Unlinked."
- Janse, Chris. 2016. "P.Berghei." Netherlands: Leids Universitairs Medisch Centrum.
- Martins, Yuri Chaves, Mary Jane Smith, Marcelo Pelajo-Machado, Guilherme

- Loureiro Werneck, Henrique Leonel Lenzi, Claudio Tadeu Daniel-Ribeiro, and Leonardo José De Moura Carvalho. 2009. "Characterization of Cerebral Malaria in the Outbred Swiss Webster Mouse Infected by Plasmodium Berghei ANKA." *International Journal of Experimental Pathology* 90 (2): 119–30. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2613.2008.00622.x>.
- Muntiha, Mohamad. 2001. *Teknik Pembuatan Preparat Dengan Pewarnaan Hematoksilin Dan. Balai Penelitian Veteriner*.
- Nurhayati. 2009. "Status Hematologi Penderita." *Majalah Kedokteran Andalas* 33 (1): 48–53.
- Oakley, Miranda S., Thomas F. McCutchan, Vivek Anantharaman, Jerrold M. Ward, Laurence Faucette, Cindy Erexson, Babita Mahajan, et al. 2008. "Host Biomarkers and Biological Pathways That Are Associated with the Expression of Experimental Cerebral Malaria in Mice." *Infection and Immunity* 76 (10): 4518–29. <https://doi.org/10.1128/IAI.00525-08>.
- Rahmad, Darmawan. 2014. "Uji Aktivitas Antiplasmodium Ekstrak Daun Sungkai (Peronema Canescens) Terhadap Mencit Jantan (Mus Musculus) Serta Implementasinya Sebagai LKS Pada Materi Protista." Universitas Bengkulu.
- Runtut, Kresna Septiandy, Loeki Enggar Fitri, and Rintis Noviyanti. 2018. "Role of Hypoxia-Inducible Factor (HIF)-1 α and CD11b in Pathogenesis of Experimental Cerebral Malaria in Mice." *Acta Microbiologica Hellenica* 63 (01): 65–72.
- Sierro, Frederic, and Georges E.R. Grau. 2019. "The Ins and Outs of Cerebral Malaria Pathogenesis: Immunopathology, Extracellular Vesicles, Immunometabolism, and Trained Immunity." *Frontiers in Immunology* 10 (830): 1–11. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00830>.
- Souza, J Brian D E, Julius C R Hafalla, and Eleanor M Riley. 2009. "Cerebral Malaria : Why Experimental Murine Models Are Required to Understand the Pathogenesis of Disease" 137. <https://doi.org/10.1017/S0031182009991715>.
- Storm, Janet, and Alistair Craig. 2014. "Pathogenesis of Cerebral Malaria-- Inflammation and Cytoadherence." *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 4 (July): 100. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2014.00100>.
- Waknine-Grinberg, Judith H., Nicholas Hunt, Annael Bentura-Marciano, James A. McQuillan, Ho Wai Chan, Wing Chi Chan, Yechezkel Barenholz, Richard K. Haynes, and Jacob Golenser. 2010. "Artemisone Effective against Murine Cerebral Malaria." *Malaria Journal* 9 (1): 1–15. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-9-227>.