

Profil Gr-1 dan CD34 Mencit yang Diinfeksi *Staphylococcus aureus* Pacsa Pemberian Ekstrak Buah Mengkudu (*Morinda citrifolia*)

Dia Faroka, Sri Rahayu, Muhaimin Rifa'i*

Progam Magister Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Brawijaya

Abstrak

Staphylococcus aureus menyebabkan berbagai penyakit infeksi sistemik, seperti endokarditis, osteomielitis, sindrom kulit melepuh, pneumonia dan penyakit *Toxic Shock Syndrom* (TSS). Faktor virulen *S. aureus* dapat menginduksi peningkatan neutrofil, inflamasi, serta menstimulasi sel T sehingga terjadi sekresi sitokin proinflamasi secara besar-besaran. *Staphylococcus aureus* resisten terhadap antibiotik sehingga mendorong masyarakat untuk mencari tanaman obat tradisional. Tanaman obat lebih efektif, efek samping lebih kecil, dan harga lebih murah dibandingkan obat sintetik. *Morinda citrifolia* dijadikan bahan alternatif pengobatan karena memiliki potensi sebagai anti mikroba, anti kanker, anti inflamasi dan antioksidan. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui profil Gr-1 dan CD34 mencit yang diinfeksi *S. aureus* pacsa pemberian ekstrak air buah mengkudu (*M. citrifolia*). Penelitian menggunakan RAL faktorial. Terdapat 2 kelompok yaitu kelompok non infeksi dan infeksi. Kedua kelompok diberi ekstrak air buah *M. citrifolia* dengan dosis berturut-turut 25 mgkgBB⁻¹, 100 mgkgBB⁻¹, dan 300 mgkgBB⁻¹ selama 20 hari kemudian diinfeksi *S. aureus* sebanyak 1×10^9 sel. Deteksi jumlah relatif Gr-1 dan CD34 menggunakan *Flow cytometry*, dianalisis dengan program *CellQuest* dan dilakukan uji statistik ANOVA dan uji BNJ menggunakan program SPSS 16. Hasil penelitian menunjukkan bahwa, pada kelompok non infeksi terjadi peningkatan Gr-1 pada dosis 100 mgkgBB⁻¹, dosis 25 mgkgBB⁻¹ dan 100 mgkgBB⁻¹ serta terjadi peningkatan dan penurunan CD34 secara signifikan ($P < 0.05$). Pada kelompok infeksi terjadi penurunan Gr-1 pada dosis 300 mgkgBB⁻¹, dan peningkatan CD34 pada dosis 100 mgkgBB⁻¹. Penurunan Gr-1 dimungkinkan karena senyawa *M. citrifolia* berperan sebagai anti inflamasi.

Kata kunci: CD34, Gr-1, *Morinda citrifolia*, *Staphylococcus aureus*

Profile of Gr-1 and CD34 of Mice Which Infected by *Staphylococcus aureus*: Post-treated of Noni (*Morinda Citrifolia*) Extract

Dia Faroka, Sri Rahayu, Muhaimin Rifa'i*

Progam Magister Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Brawijaya

Abstract

Staphylococcus aureus Rosenbach causes varies systemic infections, such as endocarditis, osteomyelitis, skin blister syndrome, pneumonia and *Toxic Shock Syndrome* (TSS). Virulent factors of *S. aureus* induce increases in neutrophils, inflammation and stimulate T cells resulted the massive secretion of proinflammatory cytokines. Bacteria *S. aureus* is resistant to antibiotic, encourages people to search traditional medicine plants. Medicinal plants play an important role in developing of new drugs because of their effectiveness, less side effects and relatively low cost compared to synthetic drugs. *Morinda citrifolia* L. is used as an alternative treatment because its potential as an anti-microbial, anti-cancer, anti-inflammatory and antioxidant. The purpose of this research is to determine the profile of Gr-1 and CD34 of mice which infected with *S. aureus* post-treated with noni fruit extract. Two groups of treatment are: non-infected and infected. Both groups were given extract of *M. citrifolia* fruit with doses of 25 mgkgBW⁻¹, 100 mgkgBW⁻¹, and 300 mgkgBW⁻¹ for 20 days and then infected with *S. aureus* by 1×10^9 cells. Detection of the relative amount of Gr-1 and CD34 using *Flow cytometry*, analyzed with the *Cell Quest* program and we perform ANOVA and HSD test using SPSS 16 program. The results showed that, the non-infection group increased Gr-1 at doses of 100 mgkgBW⁻¹, doses of 25 mgkgBW⁻¹ and 100 mgkgBW⁻¹ respectively, along the increase and decrease in CD34 significantly ($P < 0.05$). Infection occurs on the decline of Gr-1 at dose of 300 mgkgBW⁻¹, and increased of CD34 at doses 100 mgkgBW⁻¹. Gr-1 decline is assumed cause by the compound in *M. citrifolia* anti-inflammatory role.

Keywords: CD34, Gr-1, *Morinda citrifolia*, *Staphylococcus aureus*

* Alamat Korespondensi:

Muhaimin Rifa'i

Email : rifa123@ub.ac.id

Alamat : Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Brawijaya, Jl. Veteran, Malang 65154

PENDAHULUAN

Staphylococcus aureus mengakibatkan berbagai macam infeksi sistemik seperti endokarditis, osteomielitis, sindrom kulit melepuh, pneumonia dan penyakit *Toxic Shock Syndrom* (TSS) [1,2]. Superantigen *S. aureus* dapat menstimulasi sel T melalui bagian V β dari *T cell reseptor* (TCR) [3,4,5], sehingga menyebabkan sekresi secara besar-besaran sitokin proinflamasi seperti, *Tumor necrosis factor- α* (TNF- α), *Interleukin-6* (IL-6) dan *Interferon- γ* (IFN- γ) [6]. Faktor virulen *S. aureus* berupa *Panton valentine leukocidin* (PVL) dapat menginduksi *Polymorphonuclear leukocytes* (PMN) dan menstimulasi mediator inflamasi [7]. Sedangkan α -toxin dapat menstimulasi kemokin CXC, yang menginduksi pergerakan neutrofil menuju daerah inflamasi di paru-paru [8].

Aktivasi neutrofil dan makrofag merupakan respon kuat imunitas *innate* dalam melawan infeksi *S. aureus* [9]. Neutrofil direkrut pada daerah inflamasi, untuk memfagosit dan menghancurkan mikroba [10]. Sel neutrofil perifer dapat dideteksi melalui mesin *Flow cytometry* dengan anti-Gr-1 [11]. Neutrofil merupakan diferensiasi akhir dari *Hematopoietic stem cell* (HSC) melalui perkembangan progenitor myeloid, yang merupakan prekursor dari granulosit [12]. Penanda dari sel hematopoietic tersebut adalah CD34.

Meningkatnya resistensi *S. aureus* terhadap antibiotik seperti penicillin, methisilin, quinolone dan vancomycin, mendorong masyarakat untuk mencari tanaman obat. Tanaman obat berperan penting terhadap perkembangan obat baru, karena lebih efektif, efek samping lebih kecil, dan harga lebih murah dibandingkan obat sintetik [13].

Salah satu tanaman obat yang dapat digunakan untuk menjaga kesehatan adalah buah mengkudu. Buah mengkudu dijadikan bahan alternatif pengobatan karena memiliki potensi sebagai anti mikroba, anti kanker, anti inflamasi dan antioksidan [14]. Senyawa kimia yang terkandung dalam buah mengkudu yaitu asam amino, antraquinon, glikosida, flavonoid, alkaloid, tannin, komponen fenol dan asam sitrat [15]. Senyawa alkaloid, flavonoid, saponin, dan steroid pada buah mengkudu dengan tingkat kematangan yang berbeda, dapat berperan sebagai anti bakteri [16]. Scopoletin buah mengkudu juga berfungsi sebagai antibakteri [17]. Buah mengkudu dapat meningkatkan imunitas sel dan meningkatkan aktivitas makrofag untuk melawan pertumbuhan tumor

[18]. Sedangkan jus dari buah mengkudu dapat bersifat sebagai anti inflamasi [19]. Oleh karena itu penelitian ini bertujuan mengetahui ekspresi dari jumlah relatif CD34 dan Gr-1 mencit yang diinfeksi *S. aureus* pasca pemberian ekstrak buah mengkudu.

METODE PENELITIAN

Penelitian ini menggunakan hewan coba mencit yang mendapat sertifikat kelaikan etik no. 112-KEP-UB. Rancangan percobaan berupa *Rancangan Acak Lengkap Faktorial* (RAL). Kriteria mencit yaitu betina, strain DDY, berumur 6 minggu, sebanyak 32 ekor. Mencit diaklimasi selama satu minggu sebelum perlakuan. Terdapat dua kelompok perlakuan, yaitu kelompok infeksi dan kelompok non infeksi, keduanya diberi ekstrak air buah mengkudu selama 20 hari, kemudian diinfeksi *S. aureus*. Tiap kelompok terdiri dari empat perlakuan, dengan 3 ulangan. Kontrol normal kelompok non-infeksi diberi aquades tanpa diinfeksi *S. aureus*, sedangkan kontrol positif kelompok infeksi diberi aquades dan diinfeksi dengan *S. aureus*.

Pembuatan Ekstrak Buah Mengkudu

Daging buah dioven pada suhu 50°C, selama lima hari, *diblender* menjadi serbuk halus, diayak sehingga diperoleh simplisia. Simplisia sebanyak 5 gram dilarutkan dalam 50 ml akuades, dipanaskan hingga mencapai 80°C, kemudian dibiarkan 15 menit [20]. Selanjutnya, disaring menggunakan kertas saring. Dosis ekstrak buah mengkudu yang aman untuk manusia adalah 500-1000 mg per hari [21], dikonversikan pada mencit dengan mengalikan 0.0026 (berat mencit 20 mg). Dosis yang digunakan antara lain 25 mgkgBB⁻¹, 100 mgkgBB⁻¹, 300 mgkgBB⁻¹. Formula ini dicekokkan sekali setiap hari secara oral menggunakan sonde selama 20 hari.

Injeksi *S.aureus*

Stok kultur bakteri *S. aureus* diinokulasikan sebanyak 4 ml, kemudian ditambahkan media *Nutrient broth* (NB) sampai 40 ml dan kultur *dishaker*. Pada jam ke-8, 1 ml dari stok kultur dimasukkan ke dalam tabung dan disentrifugasi dengan kecepatan 10.000 rpm selama 10 menit dengan suhu 25°C. Pellet hasil sentrifugasi ditambahkan 100 μ l PBS. Larutan tersebut kemudian diinjeksikan sebanyak 100 μ l pada mencit. Jumlah bakteri *S. aureus* yang diinjeksikan sebesar 1×10^9 sel. Injeksi dilakukan pada hari ke-21 secara Intraperitoneal

menggunakan *syringe* dengan ukuran 21 ½G. Pembedahan mencit dilakukan setelah 5 hari infeksi. Proses imunitas adaptif pada umumnya bekerja 4-7 hari setelah terjadinya infeksi [12].

Isolasi Sel dan Deteksi Flow cytometry

Organ *Bone marrow* digunakan untuk mengisolasi CD34, sedangkan isolasi Gr-1 dilakukan pada paru-paru. Sebelum dilakukan isolasi, *Bone marrow* dibersihkan dari sisa jaringan otot yang menempel, kemudian di-*flush* dengan PBS 1 ml menggunakan jarum ukuran 21 ½G. Organ paru-paru ditekan dengan pangkal spuit kemudian difilter menggunakan *wire*. Sel-sel limfosit dari *bone marrow* dan paru-paru dilarutkan dalam PBS sampai 6 ml, kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 2500 rpm pada suhu 4°C selama 5 menit. Pellet diresuspensi dengan PBS 1 ml, *dipipetting*, diambil 100 µl homogenat, dilarutkan dalam 500 µl PBS. Selanjutnya larutan disentrifugasi dengan kecepatan 2500 rpm, suhu 4°C selama 5 menit. Pelet ditambahkan *rat anti-mouse anti-CD34 PE conjugated*, dan *rat anti-mouse anti-Gr-1 FITC conjugated*, sebanyak 50 ul, diinkubasi selama 30 menit pada suhu 4°C dalam kondisi gelap. Pelet yang sudah diberi antibodi ditambahkan 300 µl PBS, *dipipetting* dan dideteksi dengan mesin *Flow cytometry*.

Analisis Data Hasil Flow cytometry

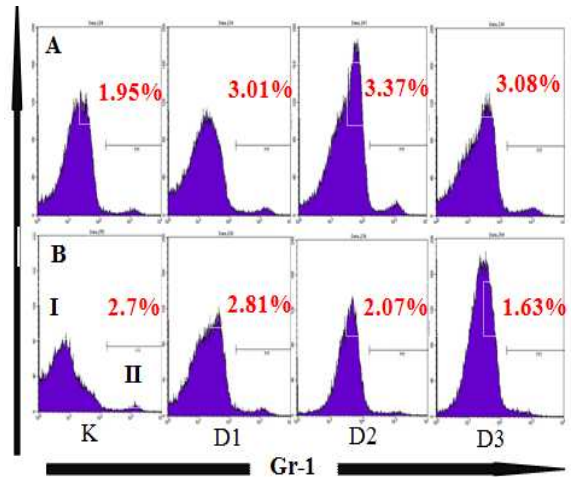
Data hasil deteksi *Flow cytometry* dianalisis menggunakan program *CellQuest*. Data yang dihasilkan berupa jumlah relatif CD34⁺ dan Gr-1, dianalisis secara statistik menggunakan ANOVA dan uji lanjut BNJ dengan menggunakan program SPSS 16.

HASIL DAN PEMBAHASAN

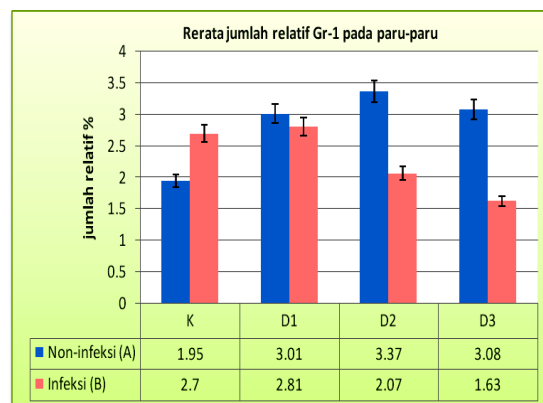
Jumlah Relatif Gr-1 di dalam Paru-Paru

Neutrofil yang bekerja dalam imunitas *innate* memiliki peranan penting untuk melawan jamur dan infeksi bakteri [22]. Berdasarkan hasil analisis program *CellQuest*, pada kontrol normal kelompok non infeksi jumlah relatif Gr-1 sebesar 1.95%, sedangkan dosis 100 mgkgBB⁻¹ menyebabkan peningkatan CD34 sebesar 3.37%. Pada kontrol positif kelompok infeksi, jumlah relative Gr-1 sebesar 2.7%, sedangkan pemberian mengkudu 300 mgkgBB⁻¹ menurunkan jumlah relative Gr-1 sebesar 1.63% (Gambar 1). Berdasarkan hasil analisis statistik uji Anova dan uji lanjut BNJ, pada kelompok non infeksi terjadi peningkatan jumlah relative Gr-1 pada dosis 100

mgkgBB⁻¹ sebesar 3.37% dibandingkan dengan kontrol normal (p>0.05), pada kelompok infeksi peningkatan dan penurunan tidak signifikan (p>0.05) (Gambar 2).



Gambar 1. Persentase jumlah relative Gr-1 pada setiap perlakuan dideteksi melalui *Flow cytometry* dan dianalisis dengan program *CellQuest* (Analisis pada organ paru-paru memakai antibodi *anti-TER119* yang dilabel dengan FITC, I=ekspresi dari sel granulosit, II = Granulosit yang mengekspresikan Gr-1, A= Non Infeksi, B= Infeksi, K= Kontrol, D1= Dosis 25 mgkgBB⁻¹, D2= Dosis 100 mgkgBB⁻¹, D3= Dosis 300 mgkgBB⁻¹).



Gambar 2. Rerata jumlah relatif Gr-1 pada setiap perlakuan hasil analisis statistik uji ANOVA RAL faktorial dan uji lanjut BNJ pada Organ spleen (K= Kontrol, D1= Dosis 25 mgkgBB⁻¹, D2= Dosis 100 mgkgBB⁻¹, D3= Dosis 300 mgkgBB⁻¹).

Sekresi neutrofil dalam proses sirkulasi secara normal 1-2% dari total populasi neutrofil pada *bone marrow* [23]. Aktivitas neutrofil secara berlebihan dalam proses inflamasi dapat menginduksi kerusakan jaringan dan disfungsi organ [24]. Peningkatan jumlah relatif Gr-1 dimungkinkan disebabkan oleh ekstrak kasar dari buah mengkudu. Menurut penelitian

sebelumnya, senyawa kimia dari ekstrak air buah mengkudu adalah karbohidrat, protein, Tannin, flavonoid, saponin, Steroid, alkaloid dan Glikosida [16]. Flavonoid dapat mempengaruhi sistem imun dan proses inflamasi [25]. Flavonoid dan Tannin merupakan komponen dari senyawa fenol yang bersifat sebagai antioksidan, antibakteri, anti-inflamasi, anti alergi, anti kanker [26].

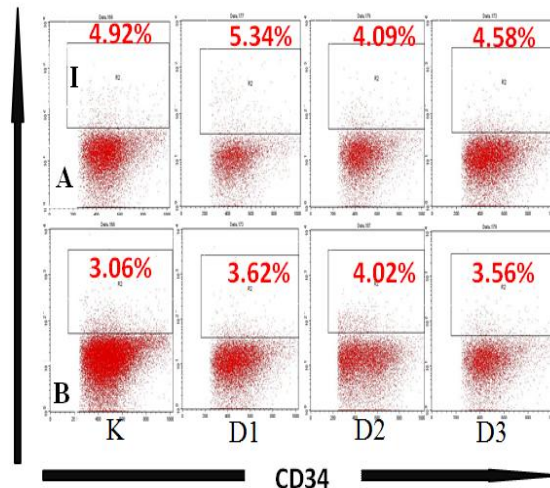
Peningkatan neutrofil pada kontrol infeksi kemungkinan disebabkan adanya *Lipoteichoic acids* (LTA) dan *peptidoglican* (PepG). Faktor virulen dari *S. aureus* memiliki kemampuan untuk membunuh neutrofil secara efektif [25]. Sedangkan protein A dapat mempengaruhi proses imunologi [28]. LTA dan PepG menyebabkan inflamasi akut pada paru-paru, melalui peningkatan PMN [29]. Infeksi *S. aureus* selama 48 jam dapat meningkatkan jumlah PMN di jaringan infeksi dan menurunkan 80% PMN didalam bone marrow [30]. Migrasi neutrofil saat terjadi infeksi, inflamasi maupun non infeksi dipengaruhi adanya sinyal kemotaktik berupa KC, MIP-2 dan receptor CXCR2 [31]. α -toxin dapat menstimulasi kemokin CXC, sehingga neutrofil menuju daerah inflamasi [8].

Pada kelompok infeksi, pemberian mengkudu dosis 300 mgkgBB⁻¹ menyebabkan penurunan jumlah neutrofil sebesar 1.63% dibandingkan dengan kontrol positif kelompok infeksi sebesar 2.7%. Hal ini disebabkan oleh senyawa dari mengkudu bersifat sebagai antiinflamasi sehingga kemungkinan dapat menurunkan jumlah relatif Gr-1. Penelitian sebelumnya menjelaskan bahwa scopoletin dari *M. citrifolia* bersifat sebagai antiinflamasi dan antibakteri [30]. Senyawa flavonoid berupa polifenol dapat menghambat ekspresi gen proinflamasi melalui penghambatan *Nuclear Factor Kappa B* (NF-Kb) [33]. Ekstrak air buah mengkudu, secara signifikan pada dosis 200 mg/kg dapat bersifat sebagai anti inflamasi [34].

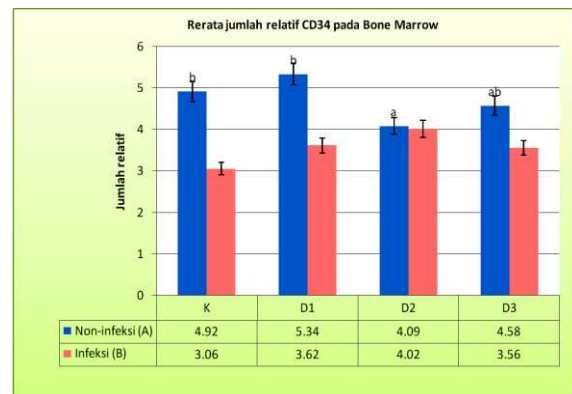
Jumlah relatif CD34 pada Bone marrow

Hasil analisis program *CellQuest* menunjukkan bahwa, pada perlakuan non infeksi dosis 25 mgkgBB⁻¹ terjadi peningkatan CD34 sebesar 5.34% dibandingkan dengan kontrol normal sebesar 4.52%. Pada kontrol positif kelompok Infeksi, jumlah relatif CD34 sebesar 3.06%, dan meningkat pada dosis 100 mgkgBB⁻¹ sebesar 4.02% (Gambar 3.) Berdasarkan hasil analisis statistik uji Anova dan uji lanjut BNJ, pemberian dosis 25 mgkgBB⁻¹ pada kelompok non infeksi, menyebabkan peningkatan CD34 sebesar 5.34%, peningkatan tersebut tidak berbeda nyata

dengan kontrol normal sebesar 4.92%. Sedangkan pemberian dosis 100 mgkgBB⁻¹ terjadi penurunan CD34 secara signifikan (P<0.05) sebesar 4.09%. Pada kelompok infeksi peningkatan dan penurunan jumlah relatif CD34 tidak signifikan (Gambar 4).



Gambar 3. Persentase jumlah relatif sel CD34 pada setiap perlakuan melalui *Flow cytometry* dan dianalisis dengan program *CellQuest* (Analisis pada organ paru-paru memakai antibodi *anti-CD34* yang dilabel dengan PE, I=ekspresi dari CD34, A = Non Infeksi, B = Infeksi, K= Kontrol, D1= Dosis 25 mgkgBB⁻¹, D2= Dosis 100 mgkgBB⁻¹, D3= Dosis 300 mgkgBB⁻¹).



Gambar 4. Rerata jumlah relatif sel CD34 pada setiap perlakuan hasil analisis uji ANOVA RAL faktorial dan uji lanjut BNJ pada organ spleen (K= Kontrol, D1= Dosis 25 mgkgBB⁻¹, D2= Dosis 100 mgkgBB⁻¹, D3= Dosis 300 mgkgBB⁻¹).

CD34 merupakan penanda dari sel-sel hematopoietik, sel-sel hematopoietik akan berdiferensiasi menjadi limfosit, granulosit maupun megakariosit [10]. Meningkatnya CD34⁺ diakibatkan adanya mitogen dan senyawa aktif dari ekstrak kasar mengkudu yang dapat

meningkatkan CD34⁺. Senyawa yang terdapat pada buah mengkudu yaitu karbohidrat, protein, asam amino, lemak, minyak, antraquinon, glycoside, flavonoid, alkaloid, tannin, fenol, asam sitrat [15]. Mitogen dari tumbuhan dapat menginduksi sistem imun yaitu proliferasi dan diferensiasi sel T dan B [35].

Penurunan CD34 dapat dimungkinkan adanya *homing* dari CD34 dan apoptosis dari CD34. Penelitian sebelumnya menjelaskan bahwa reduksi dari ekspresi CXCR4 berkontribusi terhadap mobilisasi sel CD34⁺ pada jaringan perifer [36]. Proses terjadinya apoptosis CD34 disebabkan peningkatan sel CD40⁺ pada kontrol sehat dibandingkan CD40⁻ [37]. Dalam proses apoptosis, kerja dari CD40 dimediasi oleh *Tumor necrosis factor* (TNFR) dan Fas [38]. Interaksi antara CD40 dengan Fas dapat menyebabkan proses apoptosis sel hepatosit manusia [39]. Faktor inhibitor seperti TNF α dan IFN γ dapat memediasi penghambatan sel hematopoietic [40,41,42,43,44,45]. Caspase-3/CPP32, Caspase-3/CPP32 merupakan famili dari IL-1 *converting enzyme* (ICE), yang berperan terhadap proses apoptosis pada sel mamalia [46].

KESIMPULAN DAN SARAN

Kesimpulan

Pada kelompok non infeksi terjadi peningkatan Gr-1 pada dosis 100 mgkgBB⁻¹, dosis 25 mgkgBB⁻¹ dan 100 mgkgBB⁻¹ dapat meningkatkan dan menurunkan CD34 (P<0.05). Pada kelompok Infeksi terjadi penurunan Gr-1 pada dosis 300 mgkgBB⁻¹, dan peningkatan CD34 pada dosis 100 mgkgBB⁻¹. Penurunan Gr-1 dimungkinkan karena senyawa *M. citrifolia* yang berperan anti inflamasi.

Saran

Saran yang perlu dilakukan adalah perhitungan jumlah absolut dari parameter sel-sel hemtopoietik untuk melengkapi data jumlah relatif pada penelitian ini.

Ucapan Terimakasih

Penelitian ini merupakan bagian dari penelitian Tesis, Antibodi dan Program *CellQuest* yang didanai oleh Bapak Muhaimin Rifai S.Si, Ph.D. Med.Sc. Terimakasih kepada beliau, Ibu Sri Rahayu dan Tim Imunologi yang telah banyak membantu pelaksanaan penelitian ini sehingga dapat berjalan dengan baik.

DAFTAR PUSTAKA

- [1] Ontengco, D.C., L.A. Baltazar, R.S. Santiago, R.R. Matias, C.A. Isaac. 2003. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from Filipino patients (1999-2003). *Phil. J. Microbiol. Infect. Dis.*, 17(1):4-8.
- [2] Salyers, A.A. and D.D. Whitt. 1994. *Bacterial pathogenesis a molecular approach*. Washington D.C., ASM Press, 84 p.
- [3] Llewelyn, M. and J. Cohen. 2002. Superantigens: microbial agents that corrupt immunity. *Lancet. Infect. Dis.*, 2(3): 156-162.
- [4] Rifa'i, M., Z. Shi, S.Y. Zhang, Y.H. Lee, H. Shiku, K. Isobe, H. Suzuki. 2008. CD8⁺CD12⁺ regulatory T cells recognize activated T cells via conventional MHC class I- $\alpha\beta$ TCR interaction and become IL-10-producing active regulatory cells. *International immunology*, 20 (7): 937-947.
- [5] Shi, Z., M. Rifa'i, Y.H. Lee, H. Shiku, K. Isobe, H. Suzuki. 2008. Importance of CD80/CD86-CD28 interactions in the recognition of target cells by CD8⁺CD122⁺ regulatory T cells. *Immunology*, 124 (1): 121-128.
- [6] Endharti, A.T., M. Rifa'i, Z. Shi, Y. Fukuoka, Nakahara, Y. Kawamoto, K. Takeda, K. Isobe, H. Suzuki. 2005. Cutting edge: CD8+CD122+ regulatory T cells produce IL-10 to suppress IFN-gamma production and proliferation of CD8+ T cells. *Journal of immunology*, 175 (11): 7093-7097.
- [7] Siqueira, J.A., C. Speeg-Schatz, F.I.S. Freitas, J. Sahel, H. Monteil, G. Prevost. 1997. Channel-forming leucotoxins from *Staphylococcus aureus* cause severe inflammatory reactions in a rabbit eye model. *J. Med. Microbiol.*, 46: 486-494.
- [8] Barlett A.H., T.J. Foster, A. Hayashida, P.W. Park. 2008. α -Toxin facilitates the generation of CXC Chemokine gradients and stimulates Neutrophil homing in *Staphylococcus aureus* Pneumonia. *The Journal of Infectious Diseases*, 198(10): 1529-1535.
- [9] Small, C.L., S. McCormick, N. Gill, K. Kugathasan, M. Santosuosso, N. Donaldson, D.E. Heinrichs, A. Ashkar, Z. Xing. 2008. NK cells play a critical protective role in host defense against acute extracellular *Staphylococcus aureus* bacterial infection in the lung. *J. Immunol.*, 180(8): 5558-5568.
- [10] Abbas, K. and A. Lichtman. 2005. *Cellular and Molecular Immunology*. Fifth Edition. Philadelphia: Saunders Elsevier.

- [11] Daley, J.M., A.A. Thomay, M.D. Connolly, J.S. Reichner. And J.E. Albina. 2008. Use of Ly6G-specific monoclonal antibody to deplete neutrophils in mice. *J. Leukoc. Biol.*, 83: 64–70.
- [12] Rifa'i, Muhaimin. 2011. *Autoimun dan Bioregulator*. Malang: UB Press.
- [13] Raj, V.B.A., V. Murugamani, P. Mounika, B. Madhuri. 2011. Preliminary phytochemical investigation of *Givotia Moluccana* Stem. *International Journal of Research in Pharmaceutical and Biomedical Sciences*, 2 (3): 1307-1313.
- [14] Wang, M.Y., B. West, C.J. Jensen, D. Nowicki, C. Su, A.K. Palu, G. Anderson. 2002. *Morinda citrifolia* (Noni): a literature review and recent advances in Noni research. *Acta Pharmacologica Sinica*, 23: 1127-1141.
- [15] Nayak, S. and S. Mengi. 2010. Preliminary physicochemical and phytochemical evaluation of *Morinda citrifolia* fruit extractives. *Int. J. Pharm. Sci.*, 2(4): 150-154.
- [16] Ramesh, S., M. Radhakrishnan, R. Anburaj, R. Elangomatavan, S. Patharajan. 2012. Physicochemical, phytochemical and antimicrobial studies on *Morinda citrifolia* l. Fruits at different maturity stages. *Int. J. Pharm. Sci.*, 4(5): 473-476.
- [17] Duncan, S.H., H.J. Flint, C.S. Stewart. 1998. Inhibitory activity of gut bacteria against *Escherichia coli* O157 mediated by dietary plant metabolites. *FEMS Microbiology Letters*, 164: 258-283.
- [18] Hirazumi, A. and E. Furusawa. 1999. An immunomodulatory polysaccharide-rich substance from the fruit juice of *Morinda citrifolia* (Noni) with antitumor activity. *Phytotherapeutic Research*, 13: 380-387.
- [19] Wang, L.S., H.J. Liu, Z.B. Xia, H.E. Broxmeyer, and L. Lu. 2000. Expression and activation of caspase-3/ CPP32 in CD34+ cord blood cells is linked to apoptosis after growth factor withdrawal. *Exp. Hematol.*, 28: 907-915.
- [20] Arifiandari and C. Condro. 2007. Pengaruh pemberian fraksi air buah Mengkudu (*Morinda citrifolia* L.) terhadap kadar Glutamat Piruvat Transaminase-Serum pada Mencit BALB/C yang diinduksi Vaksin Hepatitis B. Tesis. Pascasarjana Universitas Gajah Mada. Yogyakarta.
- [21] Murray M.T. 2000. Noni juice - the passing of another panacea? *Natural Medicine Online*, 3(2): 3.
- [22] McPhail L.C., S.L. Strum, P.A. Leone, S. Sozzani. 1992. The neutrophil respiratory burst mechanism. *Immunol. Ser.*, 57: 46-76.
- [23] Semerad, C.L., F. Liu, A.D. Gregory, K. Stumpf, D.C. Link. 2002. G-CSF is an essential regulator of neutrophil trafficking from the bone marrow to the blood. *Immunity*, 17(4): 413-423.
- [24] Kollef, M.H. and D.P. Schuster. 1995. The acute respiratory distress syndrome. *N. Engl. J. Med.*, 332(1): 27–37.
- [25] Middelton, E.J.R., C. Kandaswami, T.C. Theoharides. 2000. The effect of plant flavonoids on mammalian cells implications for inflammation, heart disease and cancer. *Pharmacological review*, 52(4): 673-751.
- [26] Rievere, C., J.H. Van Nguyen, L. Pieters, B. Dejaegher, Y.V. Heyden, C.V. Minh, J. Quetin-Leclercq. 2009. Polyphenols isolated from antiradical extracts of *Mallotus metcalfeanus*. *Phytochemistry*, 70: 86-94.
- [27] Voyich, J.M., K.R. Braughton, D.F. Sturdevant, A.R. Whitney, B. Said-Salim, S.F. Porcella, R.D. Long, D.W. Dorward, D.J. Gardner, B.N. Kreiswirth, J.M. Musser, F.R. Deleo. 2005. Insights into Mechanisms Used by *Staphylococcus aureus* to Avoid Destruction by Human Neutrophils. *J. Immunol.*, 175: 3907–3919.
- [28] Jawetz E, J.L. Melnick, E.A. Adelberg, G.F. Brooks, J.S. Butel, L.N. Orston. 1996. *Mikrobiologi Kedokteran*. Edisi 20. Diterjemahkan oleh Nugroho E, Maulany RF. Jakarta: Buku Kedokteran EGC :211-215
- [29] Leemans, J.C, M. Heikens, K.P. Kessel. 2003. Lipoteichoic acid and peptidoglycan from *Staphylococcus aureus* synergistically induce neutrophil influx into the lungs of mice. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, 10: 950–953.
- [30] Kim, M.H., J.L. Granik, C. Kwok, N.J. Walker, D.L. Borjesson, F.R.E. Curry, L. Miller, S.I. Simon. 2011. Neutrophil survival and c-kit+ progenitor proliferation in *Staphylococcus aureus* infected skin wounds promote resolution. *American Society of Hematology blood*, 128(7): 1812-1820.
- [31] Belperio, J.A, M.P. Keane, M.D. Burdick. 2002. Critical role for CXCR2 and CXCR2 ligands during the pathogenesis of ventilator-induced lung injury. *J. Clin. Invest.*, 110: 1703–16.
- [32] Deng, S., A.K. Palu, B.J. West, C.X. Su, B.N. Zhou, and J.C. Jensen. 2007. Lipoxigenase inhibitory constituents of the fruits of Noni

- (*Morinda citrifolia*) collected in Tahiti. *Journal of Natural Products*, 70(5):859-862.
- [33] Ruiz, P.A. and Dirk Haller. 2006. Functional Diversity of Flavonoids in the Inhibition of the Proinflammatory NF- κ B, IRF, and Akt Signaling Pathways in Murine Intestinal Epithelial Cells. *J. Nutr.*, 136 (3): 664-671.
- [34] McKoy, M.L.G., E.A. Thomas, O.R. Simon. 2002. Preliminary investigation of the anti-inflammatory properties of an Aqueous Extract from *Morinda citrifolia* (noni). *Proc. West Pharmacol. Soc.*, 45:76-78.
- [35] Folds, J.D. and J.L. Schmitz. 2003. Clinical and laboratory assessment of immunity. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 111(2): 702-11.
- [36] Alessandro, A., L. Turchetto, M. Cota, A. Cipponi, A. Brambilla, C. Arcelloni, R. Paroni, E. Vicenzi, E. Bordignon, G. Poli. 1999. Human CD34+ Cells Express CXCR4 and Its Ligand Stromal Cell-Derived Factor-1. Implications for Infection by T-Cell Tropic Human Immunodeficiency Virus. *Blood*, 94(1): 62-73.
- [37] Katerina, P., I. Mavroudi, P. Sidiropoulos, A.G. Eliopoulos, D.T. Boumpas, H.A. Papadaki. 2009. Increased expression of CD40 on Bone Marrow CD34 Hematopoietic Progenitor Cells in patients with Systemic Lupus Erythematosus contribution to Fas-Mediated Apoptosis. *Arthritis and Rheumatism*, 60(2):543-552.
- [38] Georgopoulos, N.T., L.P. Steele, M.J. Thomson, P.J. Selby, J. Southgate, and L.K. Trejdosiewicz. 2006. A novel mechanism of CD40-induced apoptosis of carcinoma cells involving TRAF3 and JNK/AP-1 activation. *Cell Death Differ*, 13(10): 1789-801.
- [39] Afford, S.C., S. Randhawa, A.G. Eliopoulos, S.G. Hubscher, L.S. Young, D. H. Adams. 1999. CD40 activation induces apoptosis in cultured human hepatocytes via induction of cell surface fas ligand expression and amplifies fas-mediated hepatocyte death during allograft rejection. *J. Exp. Med.*, 189: 441-6.
- [40] Yamashita, K., A. Takahashi, S. Kobayashi, H. Hirata, P.W.Jr. Mesner, S.H. Kaufman, S. Yonehara, K. Yamamoto, T. Uchiyama, M. Sasada. 1999. Caspases mediate tumor necrosis factor induced neutrophil apoptosis and down regulation of reactive oxygen production. *Blood*, 93(2): 674-85.
- [41] Rifai'i, M. 2010. Andrographolide ameliorate rheumatoid arthritis by promoting the development of regulatory T cells. *Journal of Tropical Life Science*, 1 (1): 5-8.
- [42] Lee, Y.H., M. Rifa'i. 2011. CD4⁺CD25⁺ FOXP3⁺ Regulatory T Cells In Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation. *Journal of Tropical Life Science*, 1 (2): 69-75.
- [43] Shi, Z., Y. Okuno, M. Rifa'i, A.T. Endharti, K. Akane, K. Isobe, H. Suzuki. 2009. Human CD8⁺CXCR3⁺ T cells have the same function as murine CD8⁺CD122⁺ Treg. *European journal of immunology*, 39 (8): 2106-2119.
- [44] Lee, Y.H., Y. Ishida, M. Rifa'i, Z. Shi, K. Isobe, H. Suzuki. 2008. Essential role of CD8⁺CD122⁺ regulatory T cells in the recovery from experimental autoimmune encephalomyelitis. *The Journal of Immunology*, 180 (2): 825-832.
- [45] Rifa'i, M., Y. Kawamoto, I. Nakashima, H. Suzuki. 2004. Essential roles of CD8⁺CD122⁺ regulatory T cells in the maintenance of T cell homeostasis. *The Journal of experimental medicine*, 200 (9): 1123-1134.
- [46] Wang, L.S., H.J. Liu, Z.B. Xia, H.E. Broxmeyer, L. Lu. 2000. Expression and activation of caspase-3/CPP32 in CD34+ cord blood cells is linked to apoptosis after growth factor withdrawal. *Exp. Hematol.*, 28: 907-915.