

Aktivitas Imunomodulator Ekstrak Buah Mengkudu pada Mencit yang Diinfeksi *Staphylococcus aureus*

(IMMUNOMODULATORS ACTIVITY OF NONI (*MORINDA CITRIFOLIA L.*) FRUIT EXTRACT IN MICE INFECTED WITH *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*)

Zumrotul Mufidah, Muhaimin Rifa'i, Sri Rahayu

Laboratorium Fisiologi Hewan, Jurusan Biologi,
Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Universitas Brawijaya, Jln. Veteran Malang, Jawa Timur 65145
Email: mufidah_zumrotul@yahoo.com

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas imunomodulator ekstrak buah mengkudu (*Morinda citrifolia L.*) pada mencit yang diinfeksi bakteri *Staphylococcus aureus*. Mencit dibagi menjadi dua kelompok, kelompok non infeksi yaitu tanpa infeksi *S. aureus* dan kelompok infeksi dengan diinfeksi *S. aureus*. Masing-masing kelompok terdiri dari kontrol (0 mg/kg BB) dosis 1 (25 mg/kg BB), dosis 2 (100 mg/kg BB), dosis 3 (300 mg/kg BB). Pemberian ekstrak buah mengkudu dilakukan selama 20 hari setiap pagi dan injeksi bakteri *S. aureus* dilakukan pada hari ke 21 dengan konsentrasi 10^9 sel/mL. Jumlah relatif *cluster of differentiation* (CD) pada sel T ($CD4^+$), sitokin interferon- α dari sel T *helper* ($CD4^+IFN-\alpha^+$), dan sel T regulator ($CD4^+CD25^+$) dihitung menggunakan *software BD FACSCalibur™ Flowcytometer*. Data hasil *flowcytometry* dianalisis menggunakan sidik ragam ($p < 0,05$) menggunakan program *SPSS 16 for windows*. Berdasarkan hasil penelitian ini diketahui bahwa pemberian ekstrak buah mengkudu bersifat imunomodulator pada mencit melalui perubahan jumlah relatif sel T $CD4^+$, $CD4^+IFN-\alpha^+$, dan $CD4^+CD25^+$ pada perlakuan non-infeksi dan infeksi. Pemberian ekstrak buah mengkudu pada kelompok non-infeksi dapat meningkatkan jumlah relatif sel T $CD4^+$, $CD4^+IFN-\alpha^+$, dan $CD4^+CD25^+$ sebagai peran dari senyawa aktif buah mengkudu yang bersifat sebagai mitogen. Pemberian ekstrak buah mengkudu pada kelompok infeksi *S. aureus* dapat menurunkan jumlah relatif sel T $CD4^+$, $CD4^+IFN-\alpha^+$, dan $CD4^+CD25^+$ sebab mengandung senyawa aktif yang bersifat antiinflamasi. Ekstrak buah mengkudu dapat digunakan sebagai terapi pencegahan penyakit infeksi oleh bakteri patogen *S. aureus* karena mempunyai senyawa aktif yang bersifat sebagai antiinflamasi.

Kata-kata kunci: *Morinda citrifolia L.*, *Staphylococcus aureus*, imunomodulator

ABSTRACT

This study aim was to determine the immunomodulatory activity of noni (*Morinda citrifolia L.*) fruit extract in mice infected with *Staphylococcus aureus*. Mice were divided into two group : non-infected and infected. Non Infected group was without *S. aureus* infection whereas the infected group was infected with *S. aureus*. Group contain control, dose 1 (25 mg/kg BW), dose 2 (100 mg/kg BW), and dose 3 (300 mg/kg BW). Oral treatment carried out for 20 days in every morning and each sample was injected with *S. aureus* at day 21 with 10^9 cell/mL. Relative number of T cell ($CD4^+$, $CD4^+CD25^+$), and cytokine interferon- α from $CD4^+$ T cell ($CD4^+IFN-\alpha^+$) subsets was measured using the *BD FACSCalibur™ Flowcytometer*. Data were analyzed by using Analysis of Varians ($p < 0,05$) and *SPSS 16 for windows*. The result showed that administration of noni crude extract was significantly change the relative number of $CD4^+$, $CD4^+IFN-\alpha^+$, and $CD4^+CD25^+$ T cells. Treatment of noni crude extract in non-infection group could increase relative number of $CD4^+$, $CD4^+IFN-\alpha^+$ and $CD4^+CD25^+$ T cells that might be caused by active compounds of noni as mitogen. Giving of noni crude extract in infected group could reduce the relative number of $CD4^+$, $CD4^+CD25^+$ and $CD4^+IFN-\alpha^+$ T cells due to it active compounds as anti-inflammation. Noni fruit extract can be used as preventive therapy on *S. aureus* infection because it contains active compounds as an anti-inflammation effect.

Keywords: *Morinda citrifolia*, *Staphylococcus aureus*, immunomodulators

PENDAHULUAN

Angka kejadian penyakit infeksi mengalami peningkatan dalam beberapa tahun terakhir, dan merupakan salah satu penyebab tingginya angka kematian di beberapa negara berkembang termasuk Indonesia (Depkes, 2003). Hal ini termasuk angka kejadian penyakit infeksi yang disebabkan oleh flora normal pada manusia seperti bakteri *Staphylococcus aureus*. Bakteri *S. aureus* merupakan patogen gram-positif yang bersifat invasif dan mampu menyebabkan berbagai penyakit pada hewan dan manusia. Pada hewan, *S. aureus* merupakan penyebab utama mastitis pada sapi (Susanti dan Margareta, 2003). Secara *in vitro*, *S. aureus* dapat menyerang dan bertahan hidup di dalam sel epitel termasuk sel endotel, sehingga sulit dikenali oleh sistem pertahanan tubuh. Bakteri *S. aureus* juga mampu membentuk koloni kecil yang berbeda atau *small-colony variants* (SCVs) yang menyebabkan infeksi *S. aureus* sulit disembuhkan dan sering berulang (Gordon dan Franklin, 2008).

Sistem pertahanan tubuh atau respons imun yang terjadi sebagai akibat adanya invasi bakteri *S. aureus* yaitu *S. aureus* sebagai antigen ketika masuk ke dalam tubuh akan dieliminasi oleh neutrofil dan makrofag sebagai perannya pada sistem imun *innate*. Selain itu makrofag juga dapat berperan sebagai *antigen presenting cells* (APC). Di dalam makrofag, bakteri akan difagositosis kemudian dikenali oleh *major histocompatibility complex II* (MHC II), kemudian akan dipresentasikan dalam bentuk antigen peptida. Selanjutnya, MHC II akan berikatan dengan limfosit T. Limfosit T diketahui mempunyai beberapa molekul permukaan atau *cluster of differentiation* (CD). Antigen peptide yang telah dipresentasikan oleh MHC II akan berikatan dengan limfosit T *helper* (CD4) pada bagian *T Cell Receptor* (TCR) (Abbas dan Lichman, 2005).

Sel T CD4⁺ yang teraktivasi akan kehilangan CD62L dan mengekspresikan berbagai molekul permukaan seperti CD25, CD44, CD69 yang bertujuan untuk melawan dan meregulasi aktivitas sel efektor yang teraktivasi akibat adanya paparan antigen bakteri (Rifa'i, 2011). Sel T CD4⁺ efektor akan mensekresikan sitokin interferon gamma (IFN- γ) yang berfungsi sebagai aktivasi makrofag, fagositosis, dan *killing* bakteri. Sel T CD4⁺ akan menghasilkan sitokin interleukin 2 (IL-2) yang memicu aktivasi sel T sitotoksik (CD8⁺) dan sel

T reg (CD4⁺CD25⁺) (Abbas dan Lichman, 2005).

Infeksi *S. aureus* menjadi masalah yang serius saat ini karena meningkatnya resistensi bakteri terhadap berbagai jenis antibiotik (*Multi Drug Resistance/MDR*). Antibiotik hanya membunuh atau menghambat bakteri yang peka. Hal ini menyebabkan seleksi strain yang resisten hingga akhirnya penggunaan antibiotik menjadi tidak efektif (Kumar *et al.*, 2011). Meluasnya resistensi bakteri terhadap obat-obatan yang ada, mendorong pentingnya penggalan sumber antibakteri dari bahan alam.

Pencegahan penyakit infeksi menggunakan bahan alam seperti buah mengkudu dilakukan sebagai tindakan pencegahan maupun pengobatan terhadap berbagai jenis penyakit infeksi yang disebabkan oleh bakteri atau fungi. Buah mengkudu diketahui mengandung beberapa senyawa aktif yang bersifat sebagai imunomodulator, sehingga diduga mampu memengaruhi respons imun tubuh yang diinfeksi bakteri. Nayak dan Sushma (2009), melaporkan bahwa ekstrak buah mengkudu dapat meningkatkan aktivitas fagositosis neutrofil dan peningkatan IL-6. Ziegler *et al.*, (2011), melaporkan bahwa sel T memiliki peranan yang penting dalam mengendalikan pertumbuhan *S. aureus* selama fase persisten.

Berdasarkan uraian di atas, maka penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas imunomodulator ekstrak buah mengkudu pada mencit yang diinfeksi bakteri *S. aureus*. Aktivitas imunomodulator dari ekstrak air buah mengkudu dapat dilihat dengan mengamati jumlah relatif subset sel limfosit T (CD4⁺, CD4⁺CD25⁺) dan jumlah relatif sitokin IFN- γ dari sel T helper (CD4⁺IFN- γ) pada organ limpa mencit. Hasil penelitian ini diharapkan dapat dijadikan sebagai bahan alternatif untuk imunomodulator dalam mengatasi infeksi bakteri *S. aureus*.

METODE PENELITIAN

Penelitian ini menggunakan mencit *specific pathogen free strain Deutschland Denken Yonken* (DDY) jenis kelamin betina, umur enam minggu dengan rata-rata bobot badan 25 g didapatkan dari Laboratorium Penelitian dan Pengujian Terpadu (LPPT) Universitas Gajah Mada Yogyakarta. Penggunaan hewan coba telah mendapatkan sertifikat Laik etik No.89, dari Komite Laik Etik Universitas Brawijaya. Herba yang diuji adalah buah mengkudu yang

didapatkan dari daerah Joyotambaksari Malang, dan bakteri uji *S. aureus* didapatkan dari Laboratorium Mikrobiologi, Fakultas Kedokteran, Universitas Brawijaya. Rancangan percobaan yang digunakan dalam penelitian ini adalah rancangan acak lengkap (RAL) pola faktorial dengan dua faktor, yaitu kelompok mencit yang tidak diinfeksi *S. aureus* (non infeksi) dan kelompok mencit yang diinfeksi *S. aureus* (infeksi).

Pengelompokan Perlakuan Hewan Coba

Hewan coba berupa mencit sebanyak 32 ekor dibagi menjadi delapan kelompok perlakuan, masing-masing kelompok terdiri dari empat ekor. Mencit diaklimasi selama satu minggu, kemudian dibagi menjadi dua kelompok perlakuan. Pada masing-masing kelompok menggunakan tiga variasi dosis sebagaimana disajikan pada Tabel 1.

Pembuatan Ekstrak Air Buah Mengkudu

Buah mengkudu yang digunakan adalah yang belum terlalu tua dan tidak terlalu muda, berwarna hijau keputihan dan masih agak sedikit keras. Bagian buah yang digunakan pada penelitian ini yaitu daging buah. Ekstraksi dilakukan dengan menggunakan pelarut aquades. Sebanyak lima gram simplisia buah mengkudu dilarutkan dalam 150 mL air dalam sebuah *beaker glass*. Kemudian dipanaskan menggunakan penangas air sampai diperoleh suhu ekstrak di dalam *beaker glass* mencapai 80p C, kemudian dipertahankan selama 15 menit. Selanjutnya, dilakukan penyaringan menggunakan kain saring sehingga didapatkan *crude* ekstrak sebagai larutan stok. *Crude* ekstrak buah mengkudu yang masuk ke dalam tubuh mencit berdasarkan pada bobot badan mencit yang ditimbang setiap hari. Pemberian ekstrak buah mengkudu dilakukan dengan menggunakan sonde lambung dengan cara dicekakan ke mencit secara oral sesuai dengan dosis yang ditentukan, satu kali selama 20 hari dengan volume pemberian ekstrak 200 µL.

Infeksi Bakteri *S. aureus*

Bakteri *S. aureus* pada medium *nutrient agar* (NA) yang telah dikonfirmasi sebelumnya dibiakkan pada medium *nutrient broth* (NB) cair dan diinkubasi selama 1 x 24 jam. Selanjutnya diambil sebanyak 1 mL dan ditambahkan 9 mL medium NB baru. Kemudian dilakukan proses penghitungan bakteri dengan menggunakan *haemocytometer* setiap satu jam, sampai

mendapatkan konsentrasi sel bakteri 10⁹ sel/mL. Setelah mendapatkan konsentrasi sel bakteri 10⁹ sel/mL, kemudian dilakukan sentrifuse dengan kecepatan 10.000 rpm selama 10 menit pada suhu 25p C. *Pellet* yang diperoleh selanjutnya disuspensi dengan 1 mL PBS. Suspensi tersebut selanjutnya diinjeksikan pada hewan coba secara intraperitoneal dengan volume 100 µL. Injeksi dilakukan pada hari ke 21 setelah perlakuan pemberian ekstrak buah mengkudu.

Uji Konfirmasi Keberadaan Bakteri *S. aureus* di Dalam Darah Mencit

Uji konfirmasi dilakukan pada hari ke 22 setelah pemberian ekstrak buah mengkudu selama 20 hari dan injeksi bakteri *S. aureus* pada hari ke 21. Darah diambil melalui ekor mencit sebanyak ±50 µL dan diletakkan di dalam tabung *ependorf*, kemudian ditambah dengan 450 µL NaCl fisiologis 0,9%. Selanjutnya, darah yang sudah dicampur dengan NaCl fisiologis kemudian diinokulasikan pada 4,5 mL media NB di dalam tabung reaksi. Kemudian dilakukan inkubasi pada *shaker* dengan suhu 37p C, 120 rpm selama 36 jam. Setelah dilakukan inkubasi, maka dilakukan penanaman pada media *mannitol salt agar* (MSA). Diambil sebanyak ±2 mL cairan hasil inkubasi dan dilakukan penanaman pada media MSA dengan cara *pour plate*. Kemudian dilakukan inkubasi pada suhu 37p C selama 24 jam. Bakteri *S. aureus* mengubah warna media dari merah menjadi kuning.

Isolasi Sel Limfosit dari Organ Limpa Mencit

Isolasi sel dilakukan pada hari ke 25, yaitu empat hari setelah perlakuan infeksi bakteri *S. aureus*. Organ limpa diambil dari mencit yang telah dikorbankan lalu dibersihkan dengan *phosphate buffer saline* (PBS). Isolasi sel-sel limfosit dari limpa dilakukan dengan cara organ limpa dipencet dengan ujung spuit, digerus dan disuspensi dengan PBS 6 mL. Selanjutnya sel-sel yang diperoleh disaring menggunakan *wire*. Kemudian hasil yang diperoleh disentrifugasi dengan kecepatan 2500 rpm pada suhu 4°C selama 5 menit. Supernatan yang diperoleh dibuang dan *pellet* diresuspensi dengan PBS 1 mL. Selanjutnya dilakukan *pipeting* untuk mendapatkan homogenat. Sebanyak 200 iL homogenat dipindahkan pada tabung mikrosentrifuse baru dan ditambah 500 iL PBS. Kemudian dilakukan sentrifuse pada 2500 rpm, suhu 4°C selama 5 menit. Supernatan dibuang

dan *pellet* selanjutnya diinkubasi dengan antibodi untuk proses analisis selanjutnya.

Analisis Flowcytometry

Analisis *Flowcytometry* dilakukan untuk mendeteksi populasi sel yang mengekspresikan CD4⁺, CD4⁺ IFN- γ ⁺, dan CD4⁺CD25⁺. Pada penelitian ini, sel-sel yang diisolasi dari limpa diinkubasi dengan antibodi yang sesuai selama 15 menit dalam *ice box*. Antibodi yang digunakan yaitu *rat anti-mouse anti-CD4 FITC conjugated*, *rat anti-mouse anti-CD25 PE conjugated*, *rat anti-mouse anti-IFN- γ PE conjugated*. Selanjutnya dilakukan koneksi dengan komputer dan *flowcytometer* disetting pada keadaan *acquiring* serta dilakukan *setting* sesuai parameter yang akan dianalisis. Sampel yang telah diinkubasi dengan antibodi ditambah 300 μ L PBS dan ditempatkan pada kuvet *flowcytometer*. Selanjutnya dipilih *acquire* dan *flowcytometer* akan menghitung jumlah sel total serta jumlah sel yang terdeteksi oleh label antibodi. Hasil yang diperoleh selanjutnya diolah dengan *BD cellquest Pro*TM.

Analisis Data

Data hasil dari mesin *flowcytometry* dianalisis menggunakan *software CellQuest*. Data dari mesin *flowcytometry* dimasukkan dalam program *CellQuest*. Selanjutnya program diatur sesuai pewarnaan dan jenis sel yang diidentifikasi. *Gated* dilakukan berdasarkan pola ekspresi sel yang terlihat dalam layar komputer. Data hasil analisis menggunakan *CellQuest* selanjutnya ditabulasi, kemudian diuji statistika menggunakan *two way analysis of*

variance melalui program SPSS 16.0. Apabila diperoleh hasil yang signifikan ($p < 0,05$), maka dilakukan uji lanjut menggunakan uji *Tukey*.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Jumlah Relatif Sel T CD4⁺ dan CD4⁺IFN- γ ⁺

Hasil pengamatan terhadap jumlah relatif sel T CD4⁺ pada penelitian ini terlihat bahwa pemberian ekstrak buah mengkudu dapat memengaruhi jumlah relatif sel T CD4⁺ ($p < 0,05$) pada limpa mencit kelompok non-infeksi dan infeksi bakteri *S. aureus*. Pada kelompok non infeksi (F1), pemberian ekstrak buah mengkudu dosis 25 mg/kg BB dan 100 mg/kg BB diketahui dapat meningkatkan jumlah relatif sel T CD4⁺ tetapi tidak berbeda nyata dengan perlakuan kontrol negatif yang diberi perlakuan akuades. Pemberian ekstrak buah mengkudu dosis 300 mg/kg BB menurunkan jumlah relatif sel T CD4⁺ dan tidak berbeda nyata dengan kelompok perlakuan kontrol negatif. Pemberian ekstrak buah mengkudu pada kelompok non infeksi (F1) dosis 25 mg/kg BB dan 100 mg/kg BB diketahui dapat meningkatkan jumlah relatif sel T CD4⁺ ini sejalan dengan penelitian Nandhasri *et al.*, (2011) bahwasannya pemberian bio-ekstrak buah mengkudu dapat meningkatkan proliferasi sel limfosit CD4⁺ dan CD8⁺ pada kultur *human peripheral blood mononuclear cells*. Pemberian ekstrak buah mengkudu dapat menurunkan jumlah relatif sel T CD4⁺ pada dosis 300 mg/kg BB akan tetapi tidak berbeda nyata dengan kontrol negatif sejalan dengan penelitian yang dilakukan oleh Li *et al.*, (2008) yang

Tabel 1. Pengelompokan dosis ekstrak buah mengkudu dan perlakuan infeksi bakteri *S. aureus*.

Infeksi <i>S. aureus</i>	Perlakuan Ekstrak Buah Mengkudu (<i>Morinda citrifolia</i> L.)
Non infeksi (F1)	P0F1(K-) Kontrol Normal
	P1F1 Ekstrak buah <i>M. citrifolia</i> dosis 1 (25 mg/kg BB) – non infeksi <i>S. aureus</i>
	P2F1 Ekstrak buah <i>M. citrifolia</i> dosis 2 (100 mg/kg BB) – non infeksi <i>S. aureus</i>
	P3F1 Ekstrak buah <i>M. citrifolia</i> dosis 3 (300 mg/kg BB) – non infeksi <i>S. aureus</i>
Infeksi (F2)	P0F2(K+) Kontrol positif
	P1F2 Ekstrak buah <i>M. citrifolia</i> dosis 1 (25 mg/kg BB) – infeksi <i>S. aureus</i>
	P2F2 Ekstrak buah <i>M. citrifolia</i> dosis 2 (100 mg/kg BB) – infeksi <i>S. aureus</i>
	P3F2 Ekstrak buah <i>M. citrifolia</i> dosis 3 (300 mg/kg BB) – infeksi <i>S. aureus</i>

mengemukakan bahwa pemberian ekstrak buah mengkudu hasil fermentasi dapat menurunkan jumlah relatif CD4⁺ pada limpa, akan tetapi meningkatkan jumlah relatif CD4⁺ pada jaringan *peritoneum* dan perifer darah. Pada kelompok perlakuan infeksi (F2), didapatkan data bahwasannya pemberian ekstrak buah mengkudu berpengaruh terhadap jumlah relatif sel T CD4⁺ pada mencit yang diinfeksi *S. aureus* (p<0,05). Jumlah relatif sel T CD4⁺ mengalami penurunan pada mencit yang diinfeksi *S. aureus* setelah pemberian ekstrak buah mengkudu dosis 25 mg/kg BB, 100 mg/kg BB, 300 mg/kg BB dan berbeda nyata dengan kelompok kontrol positif (Gambar 1, Tabel 2).

Sel T *helper* (Th) atau sel T CD4⁺ berdiferensiasi menjadi dua subset, yaitu Th1 dan Th2. Sel Th1 memberikan proteksi terhadap patogen intraseluler dan virus, sedangkan sel Th2 memberikan bantuan dalam mengeliminasi beberapa patogen ekstraseluler (Szabo *et al.*, 2000). Sitokin interferon- γ (IFN- γ) merupakan sitokin yang berperan dalam aktivasi makrofag, meningkatkan fagositosis, produksi sitokin dan kemokin serta ekspresi MHC I dan MHC II (Abbas dan Lichman., 2005). Sitokin IFN- γ dapat meningkatkan respons *cellular mediated immunity* (CMI) dengan mengaktivasi makrofag dan menginduksi diferensiasi sel CD4⁺*naïve* menjadi subset Th1 dan mencegah proliferasi sel Th2 (Shi *et al.*, 2012).

Hasil pengamatan terhadap jumlah relatif sel T CD4⁺IFN- α ⁺ pada penelitian ini terlihat

bahwa pemberian ekstrak buah mengkudu dapat meningkatkan jumlah relatif CD4⁺IFN- γ ⁺ (p<0,05) pada limpa mencit kelompok non-infeksi dan infeksi bakteri *S. aureus*. Peningkatan jumlah relatif sitokin IFN- γ pada sel T CD4⁺ (CD4⁺IFN- γ ⁺) setelah pemberian ekstrak buah mengkudu dosis 25 mg/kg BB, 100 mg/kg BB dan 300 mg/kg BB pada kelompok perlakuan non-infeksi (F1), diduga disebabkan karena adanya senyawa aktif pada buah mengkudu yang bersifat sebagai mitogen (Gambar 2, Tabel 2). Mitogen merupakan zat yang dapat merangsang sel untuk melakukan mitosis. Rangsangan mitogen dapat menginduksi sel-sel timus (timosit) untuk meningkatkan transkripsi interferon- γ (IFN- γ) dan *transforming growth factor Beta* (TGF- β). Peningkatan transkripsi berlanjut dengan translasi akan menghasilkan peningkatan sitokin-sitokin, di antaranya sitokin IFN- γ dan TGF- β . Tingginya induksi transkripsi IFN- γ dan TGF- β akan meningkatkan jumlah reseptor pada sel T (TCR) yang matang (Peters *et al.*, 2003).

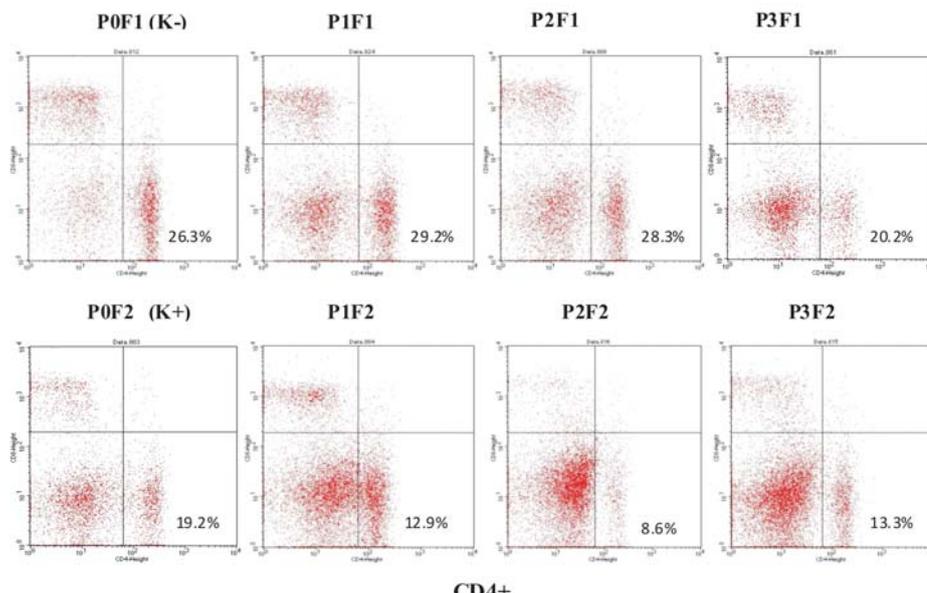
Pada kelompok infeksi (F2), pemberian ekstrak buah mengkudu dosis 25 mg/kg BB, 100 mg/kg BB, dan 300 mg/kg BB dan diinfeksi bakteri *S. aureus* memiliki penurunan jumlah relatif CD4⁺IFN- γ ⁺ jika dibandingkan dengan kontrol positif. Schmalzer *et al.*, (2010), melaporkan bahwa enam hari setelah infeksi *S. aureus*, diketahui terdapat peningkatan produksi IFN γ , IL-17 dan IL-4 yang mengindikasikan adanya aktivasi awal dari

Tabel 2. Rataan persentase jumlah relatif sel T CD4⁺, CD4⁺IFN- α ⁺ dan sel T CD4⁺CD25⁺ Pada Limpa mencit

Perlakuan	CD4 ⁺	CD4 ⁺ IFN- α ⁺	CD4 ⁺ CD25 ⁺
Kontrol negatif	26,3±3,7 ^{ab}	1,6±0,3 ^a	2,8±0,6 ^{ab}
Mengkudu 25 mg/kg bb	29,2±4,0 ^b	2,3±0,2 ^{ab}	3,0±0,6 ^{ab}
Mengkudu 100 mg/kg bb	28,3±3,0 ^{ab}	2,9±1,3 ^{ab}	3,7±0,2 ^b
Mengkudu 300 mg/kg bb	20,2±4,8 ^a	3,6±0,5 ^b	2,3±0,0 ^a
Kontrol positif	19,2±2,1 ^b	2,8±0,2 ^c	3,6±0,7 ^a
Mengkudu 25 mg/kg bb + <i>S.aureus</i>	12,9±3,8 ^a	1,5±0,3 ^a	3,5±0,4 ^a
Mengkudu 100 mg/kg bb + <i>S.aureus</i>	8,6±1,6 ^a	1,9±0,4 ^{ab}	2,6±0,2 ^a
Mengkudu 300 mg/kg bb + <i>S.aureus</i>	13,3±1,8 ^a	2,3±0,5 ^{bc}	2,7±0,8 ^a

Keterangan:

- Huruf superscript yang sama pada baris yang sama menunjukkan tidak ada perbedaan nyata (p>0,05)
- CD4⁺ : Marker sel T *helper*
- CD4⁺IFN- α ⁺ : Marker sitokin IFN- α pada sel T *helper*
- CD4⁺CD25⁺ : Marker sel T regulator

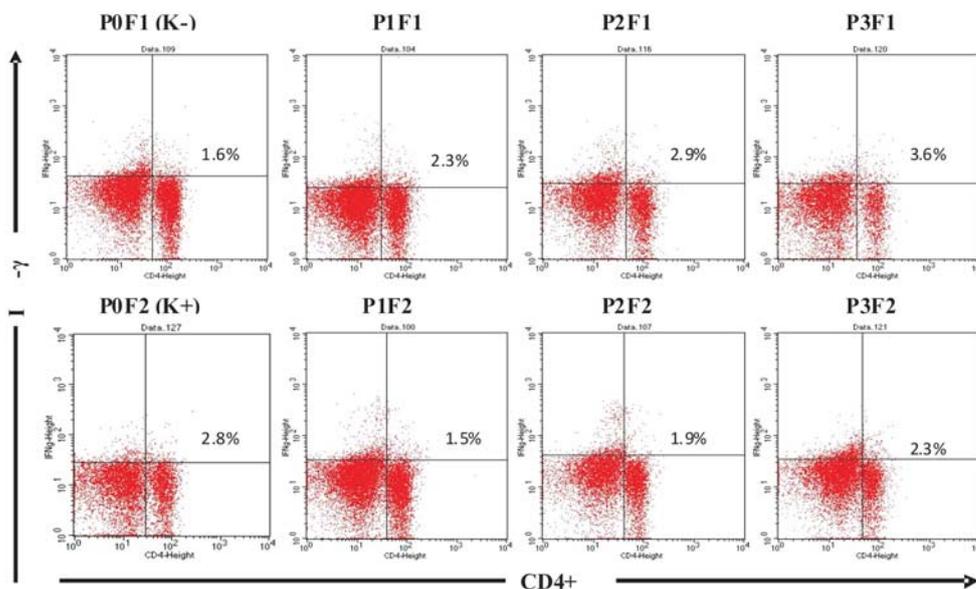


Gambar 1. Persentase Jumlah Relatif Sel T CD4⁺ Pada Setiap Perlakuan Hasil Analisa Menggunakan *Flowcytometry* Pada Organ Limpa (K- = Kontrol negatif, K+ = Kontrol positif, F1 = Faktor non infeksi, F2 = Faktor Infeksi, P0 = Dosis 0, P1 = Dosis 25 mg/kg BB, P2 = Dosis 100 mg/kg BB, P3 = Dosis 300 mg/kg BB). Pada gambar ini setiap titik pada panel menunjukkan satu sel yang terdeteksi oleh mesin *flowcytometry*. Analisis dilakukan dengan menggunakan software *cellquest*.

Keterangan:

Sumbu X : jumlah relatif sel T CD4⁺

Sumbu Y : jumlah relatif sel T CD8⁺ (*data not show*)

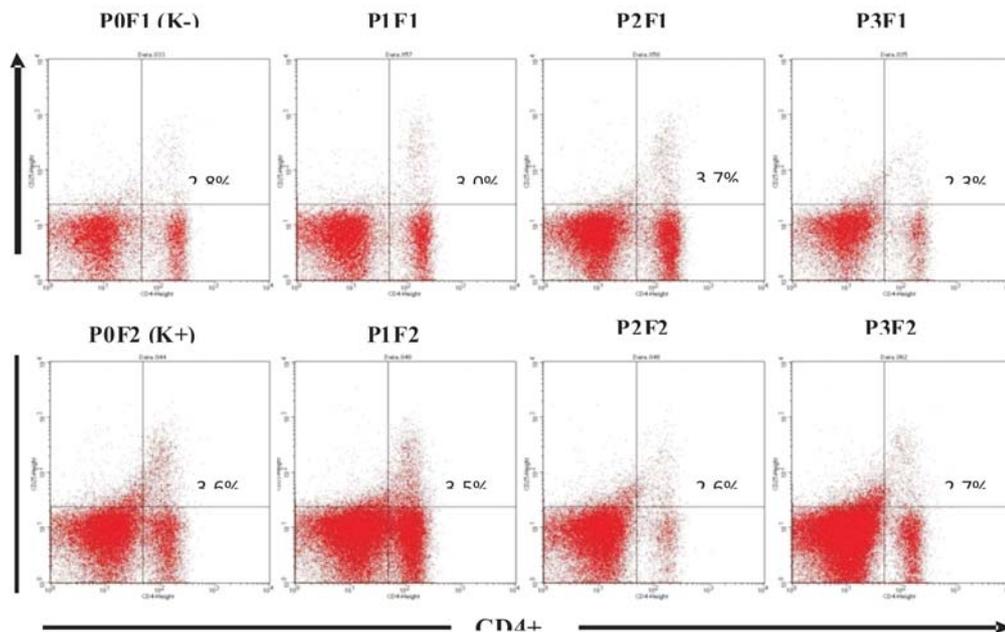


Gambar 2. Persentase Jumlah Relatif Sel CD4⁺IFN-̑⁺ Pada setiap perlakuan Hasil Analisa Menggunakan *Flowcytometry* Pada Organ Limpa (K- = Kontrol negatif, K+ = Kontrol positif, F1 = Faktor non infeksi, F2 = Faktor Infeksi, P0 = Dosis 0, P1 = Dosis 25 mg/kg BB, P2 = Dosis 100 mg/kg BB, P3 = Dosis 300 mg/kg BB). Pada gambar ini setiap titik pada panel menunjukkan satu sel yang terdeteksi oleh mesin *flowcytometry*. Analisis dilakukan dengan menggunakan software *cellquest*.

Keterangan:

Sumbu X : jumlah relatif sel T CD4⁺

Sumbu Y : jumlah relatif sitokin IFN-̑⁺



Gambar 3. Persentase Jumlah Relatif sel T CD4⁺CD25⁺ Pada Setiap Perlakuan Hasil Analisa Menggunakan *Flowcytometry* Pada Organ Limpa (K- = Kontrol negatif, K+ = Kontrol positif, F1 = Faktor non infeksi, F2 = Faktor Infeksi, P0 = Dosis 0, P1 = Dosis 25 mg/kg BB, P2 = Dosis 100 mg/kg BB, P3 = Dosis 300 mg/kg BB). Pada gambar ini setiap titik pada panel menunjukkan satu sel yang terdeteksi oleh mesin *flowcytometry*. Analisis dilakukan dengan menggunakan software *cellquest*.

Keterangan:

Sumbu X : jumlah relatif sel T CD4⁺
 Sumbu Y : jumlah relatif sel T CD25⁺

respons imun adaptif. Jumlah relatif CD4⁺IFN- γ ⁺ pada kelompok perlakuan pemberian dosis ekstrak buah mengkudu dengan tiga dosis yang berbeda dan diinfeksi *S. aureus* mengalami penurunan jika dibandingkan dengan kelompok kontrol positif. Hal ini diduga karena adanya respons antiinflamasi yang dihasilkan oleh senyawa-senyawa aktif dari ekstrak buah mengkudu sebagai akibat adanya infeksi *S.aureus*. Sitokin IFN- γ ⁺ merupakan sitokin pro-inflamasi yang bertanggung jawab terhadap adanya reaksi inflamasi dalam tubuh. Inflamasi merupakan respons pertahanan tubuh ketika terjadi infeksi.

Bakteri *S. aureus* merupakan patogen yang diketahui mempunyai *lipoteicoic acid* pada permukaan bakteri dan memungkinkan patogen ini dapat dikenali melalui *toll-like receptors* II (TLR2). *Signaling* oleh reseptor ini selanjutnya menstimulasi produksi IL-12 yang selanjutnya menstimulasi tersekresinya IFN- γ (Teixeira *et al.*, 2008). Selain itu, bakteri *S. aureus* dapat mengaktivasi respons imun adaptif melalui induksi superantigen (Fraser dan

Proft., 2008). Interaksi antara superantigen dengan sel dapat menginduksi produksi sitokin dan kemokin secara besar-besaran. Sitokin *tumor necrosis factor- α* (TNF- α) dan IL-1 mempunyai aktivitas imunostimulan dan bekerja sinergis dengan IFN- γ untuk meningkatkan reaksi imun dan inflamasi. Akan tetapi, sitokin-sitokin tersebut pada konsentrasi yang tinggi menjadi pathogen dan dapat menginduksi *toxic shock* (Krakauer, 2011). Dengan demikian, dapat diduga bahwasannya pada ekstrak buah mengkudu mempunyai senyawa aktif yang berfungsi sebagai agen antiinflamasi sebagai respons adanya superantigen yang mengakibatkan *toxic shock* pada mencit yang diinfeksi bakteri *S. aureus*.

Buah mengkudu diketahui mempunyai beberapa senyawa aktif yang dapat berperan sebagai antibakteri, antifungal, antitumor dan antiinflamasi (Wang *et al.*, 2002; Mahattanadul *et al.*, 2010). Beberapa kandungan senyawa aktif buah mengkudu di antaranya *scopoletin* yang merupakan turunan dari *coumarin*. Senyawa aktif *scopoletin* pada buah mengkudu diduga

berkontribusi sebagai agen antiinflamasi dan mempunyai aktivitas sebagai antioksidan (Deng *et al.*, 2007; Ikeda *et al.*, 2009). *Scopoletin* dapat memengaruhi ekspresi sitokin inflamasi melalui penghambatan faktor transkripsi *nuclear factor* (NF)- κ B yang mengakibatkan penghambatan produksi atau sekresi dari sitokin-sitokin pro-inflamasi (Moon *et al.*, 2007; Deng *et al.*, 2007).

Jumlah Relatif Sel T reg (CD4⁺CD25⁺)

Indikasi adanya mekanisme regulasi yang mengiringi perubahan populasi sel T CD4⁺ dan CD4⁺IFN- α ⁺, ditunjukkan dengan profil populasi sel T regulator (T reg). Oleh sebab itu, pada penelitian ini dilakukan analisis terhadap populasi sel T reg CD4⁺CD25⁺ pada limpa. Pemberian ekstrak buah *M. citrifolia* diketahui dapat memengaruhi jumlah relatif sel T CD4⁺CD25⁺ ($p < 0,05$) pada limpa mencit kelompok non-infeksi dan infeksi bakteri *S. aureus*. Pada kelompok non-infeksi (F1), diketahui bahwa pemberian ekstrak buah mengkudu dosis 25 mg/kg BB dan 100 mg/kg BB dapat meningkatkan populasi sel T reg (CD4⁺CD25⁺), dan pada pemberian ekstrak buah mengkudu dosis 300 mg/kg BB dapat menurunkan populasi sel T reg meskipun tidak berbeda nyata dengan kontrol negatif yang diberi akuades (Gambar 3, Tabel 2). Adanya peningkatan populasi jumlah relatif sel T reg pada perlakuan pemberian ekstrak buah mengkudu dosis 100 mg/kg BB sejalan dengan adanya peningkatan populasi jumlah relatif sel T CD4⁺. Hal ini diduga sebagai mekanisme regulasi yang mengiringi peningkatan populasi jumlah relatif sel T CD4⁺. Fenomena meningkatnya populasi T reg ini mendukung adanya hipotesis tentang adanya mekanisme regulasi oleh T reg untuk mengimbangi kenaikan jumlah sel T CD4⁺ dan CD8⁺ (Albab, 2012).

Sel T reg memodulasi respons imun melalui migrasi selektif dan berakumulasi pada situs tempat regulasi sistem imun dibutuhkan. Data hasil penelitian hingga saat ini mengindikasikan bahwa kapasitas migrasi dan *trafficking* sel T reg dikontrol oleh sinyal spesifik dari *chemokine* dan reseptornya, serta *integrin* dan ligan yang memediasi *trafficking* sel T reg ke situs inflamasi atau organ perifer (Wei *et al.*, 2006). Dalam sistem imun, sel regulator ini memiliki peran yang sangat penting untuk menciptakan kondisi toleran dan menjaga homeostasis. Sel T reg ini diperlukan untuk mengendalikan sel efektor yang teraktivasi. Sel T reg mempunyai

kemampuan kendali terhadap sel lain yang terlibat pada sistem imun. Daya kendali ini diperlukan untuk menghindari terjadinya autoreaktivitas sel-sel efektor (Rifa'i *et al.*, 2004).

Pada perlakuan infeksi (F2), didapatkan data bahwa pada kelompok kontrol positif mempunyai jumlah relatif CD4⁺CD25⁺ yang meningkat jika dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif. Hasil ini mirip dengan laporan Shiu *et al.*, (2004) bahwasanya terjadi peningkatan populasi CD4⁺CD25⁺ pada pasien penderita infeksi kronik yang disebabkan oleh bakteri *S. aureus*. Pada bakteri *S. aureus* terdapat superantigen (SAg) yang merupakan toksin dan terdapat pada *S. aureus* yang dapat men-*subvert* fungsi supresif pada sel T reg (CD4⁺CD25⁺). Pada perlakuan pemberian ekstrak buah mengkudu dosis 25 mg/kg BB, 100 mg/kg BB, dan 300 mg/kg BB diketahui menurunkan jumlah relatif sel T CD4⁺CD25⁺, meskipun penurunan ini tidak berbeda nyata dengan kontrol positif. Hal ini diduga karena adanya respons antiinflamasi dari beberapa senyawa aktif yang terkandung dalam ekstrak buah mengkudu.

Sel T dari populasi CD4 yang mengekspresikan CD25 (CD4⁺CD25⁺) dikenal sebagai sel imun yang mampu mengendalikan sel imun lain, dan sel-sel yang mampu mengendalikan sel lain disebut sel regulator. Sel regulator yang berfungsi sebagai sel supresor memiliki arti penting dalam mencegah terjadinya inflamasi. Sel-sel yang hanya mengandung CD4 atau CD4⁺ tanpa adanya CD25 (CD4⁺CD25⁻) menyebabkan aktivasi berbagai sel yang memicu keluarnya sitokin sehingga sitokin dalam tubuh akan meningkat dan terjadi berbagai inflamasi. Perubahan itu terjadi jika CD4⁺CD25⁻ mengalami suatu aktivasi oleh stimuli yang sesuai. Akan tetapi, CD4⁺CD25⁺ yang berasal dari induksi CD4⁺CD25⁻ tidak memiliki sifat sebagai sel regulator. Molekul yang berperan pada sel regulator sehingga mampu menjadi pengendali sel imun yang lain telah banyak terdokumentasi, di antaranya: *forkhead box P3* (Foxp3), *Glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor* (GITR), dan *transforming growth factor- β* (TGF- β) (Rifa'i, 2011).

Hasil penelitian menunjukkan bahwasannya pemberian ekstrak buah mengkudu pada mencit kelompok non infeksi dapat meningkatkan jumlah relatif sel T CD4⁺, CD4⁺IFN- γ ⁺, dan sel T reg CD4⁺CD25⁺. Hal ini diduga karena adanya senyawa aktif pada buah mengkudu yang dapat

berfungsi sebagai mitogen. Pemberian ekstrak buah mengkudu pada mencit yang diinfeksi *S. aureus* dapat menurunkan jumlah relatif sel T CD4⁺, CD4⁺IFN- γ ⁺, dan sel T reg CD4⁺CD25⁺ karena adanya senyawa aktif pada buah mengkudu yang berperan sebagai antiinflamasi. Hal ini sesuai dengan laporan Rastini *et al.*, (2010) bahwa pemberian ekstrak buah mengkudu dapat menghambat aktivasi dari *nuclear factor kappa* β (NF κ β) yang bertanggung jawab terhadap proses inflamasi. Faktor transkripsi NF- κ B merupakan kunci regulator inflamasi dan bertindak *downstream* terhadap banyak reseptor permukaan sel termasuk molekul MHC kelas II dan *toll-like receptors*/TLR (Krakauer, 2011). Faktor transkripsi NF- κ B yang aktif dapat menginduksi terbentuknya sitokin proinflamasi dalam sistem imun seperti sitokin TNF- α , IFN- γ , molekul adesi seperti: *vascular cell adhesion molecule-1* (VCAM-1), dan *intercellular adhesion molecule-1* (ICAM-1) (Middleton *et al.*, 2000).

SIMPULAN

Buah mengkudu mempunyai beberapa senyawa aktif yang mampu berperan sebagai agen imunomodulator. Buah mengkudu dapat digunakan sebagai terapi pencegahan penyakit infeksi yang disebabkan oleh bakteri *S. aureus* karena mempunyai senyawa aktif yang bersifat sebagai antiinflamasi.

SARAN

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mengkaji dosis efektif dan penggunaan pelarut yang berbeda dalam ekstrak buah mengkudu berkaitan dengan potensinya sebagai terapi pencegahan penyakit infeksi bakteri *S. aureus*.

UCAPAN TERIMAKASIH

Ucapan terima kasih yang sebesar-besarnya penulis sampaikan kepada seluruh jajaran pimpinan dan staf di jurusan Biologi, Fakultas MIPA, Universitas Brawijaya yang telah membantu penulis dalam penyediaan antibodi dan *software CellQuest* untuk analisis hasil *flowcytometry*.

DAFTAR PUSTAKA

- Abbas AK, Lichman, AH. 2005. *Basic Immunology: Function and Disorder of The Immun System*. China: Elsevier. Pp 134-349.
- Albab FA. 2012. Modulasi Sistem Imun Lokal dan Sistemik Pasca Paparan Devine Filter. *Tesis*. Malang: Universitas Brawijaya.
- Deng S, Palu AK, West BJ, Su CX, Zhou BN, Jensen JC, 2007. Lipoxygenase inhibitory constituents of the fruits of Noni (*Morinda citrifolia*) collected in Tahiti. *Journal of Natural Products* 70: 859–862.
- Depkes. 2003. Imunisasi untuk anak dan Dewasa. *HTA Indonesia*: 1-22.
- Fraser JD, Proft T. 2008. The bacterial superantigen and superantigen-like proteins. *Immunol Rev* 225: 226–243.
- Gordon RJ, Franklin DL. 2008. Pathogenesis of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Infection. *Clin Infect Dis* 46 (5) : S350-S359.
- Ikeda R, Wada M, Nishigaki T, Nakashima K. 2009. Quantification of coumarin derivatives in Noni (*Morinda citrifolia*) and their contribution of quenching effect on reactive oxygen species. *Food Chemistry* 113: 1169–1172.
- Krakauer T. 2011. Comparative Potency of Green Tea and Red Wine Polyphenols in Attenuating Staphylococcal Superantigen-Induced Immun Responses. *American Journal Biomedical Sciences* 4 (2): 157-166.
- Kumar P, Sukhla I, Varshney S. 2011. Nasal screening of Healthcare workers for nasal carriage of coagulase positive MRSA and Prevalence of nasal Colonization with *Staphylococcus aureus*. *Biology and Medicine* 3 (2): 182-186.
- Li J, Stickel SL, Verville HB, Burgin KE, Yu X, Wong DKW, Wagner TE, Wei Y. 2008. Fermented Noni Exudate (fNE): A mediator between immun system and anti-tumor activity. *Oncology Reports* 20: 1505-1509.
- Mahattanadul S, Ridditid, Nima SW, Phdoongsombut N, Ratanasuwon P, Kasiwong S. 2010. Effects of *Morinda citrifolia* aqueous fruit extract and its biomarker scopoletin on reflux esophagitis and gastric ulcer in rats. *Journal of Ethnopharmacology*. 134:243-250.

- Midleton EK, Chithan K, Theoharis CT. 2000. The Effects of Plant Flavonoids on Mammalian Cells: Implications for Inflammation, Heart Disease, and Cancer. Department of Pharmacology and Experimental Therapeutics. Tufts University School of Medicine. Boston. Massachusetts (T.C.T.). 52 (4): 673-751
- Moon PD, Lee BH, Jeong HJ, An HJ, Park SJ, Kim HR, Ko SG, Um JY, Hong SH, Kim HM. 2007. Use of scopoletin to inhibit the production of inflammatory cytokines through inhibition of the IB/NF-B signal cascade in the human mast cell line HMC-1. *European Journal of Pharmacology* 555: 218–225.
- Nandhasri P, Sopit T, Tadsanee P, Somboon K. 2011. Bio-extract Concentrated of Thai *Yoré Morinda citrifolia* Effects in Analgesic, Acute Toxicity and Human Peripheral Blood Mononuclear Cells. *Thammasat Medical Journal* 11 (1):8-17.
- Nayak S, Sushma M. 2009. Immunostimulant activity of the extracts and bioactives of the fruits of *Morinda citrifolia*. *Pharmaceutical Biology* 47 (3): 248–254.
- Peters B, Schneider SR, Boltze C, Jager V, Epplen J, Landt O, Rys J, Roessner A. 2003. Elevated Telomerase activity, c-MYC-, and Htert mRNA expression: association with tumour progression in malignant lipomatous tumours. *J Pathol* 199: 517-525.
- Rastini EK, Aris WM, Saifur RM. 2010. Pengaruh Pemberian Ekstrak Buah Mengkudu (*Morinda citrifolia* L.) Terhadap Aktivasi NF- κ B dan Ekspresi Protein (TNF- α , ICAM-1) pada Kultur Sel Endotel (HUVECs) Dipapar Ox-LDL. *J Exp Life Sci* 1 (1):48-55
- Rifa'i M, Kawamoto Y, Nakashima I, Suzuki H. 2004. Essential Roles of CD8⁺CD122⁺ Regulatory T cells in the maintenance of T Cell Homeostasis. *J Exp Med* 9:1123-1134.
- Rifa'i M. 2011. *Autoimun dan Bioregulator*. Malang: UB Press. Hal 29-164.
- Schamaler M, Jann NJ, Ferracin F, Landmann R. 2010. T and B cells are not required for clearing *Staphylococcus aureus* in systemic infection despite a strong TLR2-MyD88-dependent T cell activation. *J Immunol* 186(1):443-52.
- Shi F, Gisela F. 2012. IFN-gamma, IL-21 and IL-10 co expression in evolving autoimmune vitiligo lesions of Smyth line chickens. *J Invest Dermatol* 132(3): 642-649.
- Shiou L, Elena G, Clifton H, Donald Y. 2004. T regulatory cells in atopic dermatitis and subversion of their activity by superantigens. *J. Allergy Clin Immunol* 113(4): 756-762.
- Susanti R, Margareta R. 2003. Aktivitas Fagositosis Neutrofil Terhadap *Staphylococcus aureus* Isolat Sapi di Jawa Tengah dengan Teknik Acridine Orange Fluorescence. *Berkala Penelitian Hayati*: 61-66.
- Szabo SJ, Sean TK, Gina LC, Xiankui ZC, Garrison F, Laurie HG. 2000. A novel Transcription Factor, T-bet, Directs Th1 Lineage Commitment. *Cell* 100: 655-669.
- Teixeira FM, Fernandes BF, Rezende AB, Machado RRP, Alves CCS, Perobelli SM, Nunes SI, Farias RE, Rodrigues MF, Ferreira AP, Oliveira SC, Teixeira HC. 2008. *Staphylococcus aureus* infection after splenectomy and splenic autotransplantation in BALB/c mice. *Clinical and Experimental Immunology* 154: 255–263.
- Wang MY, West BJ, Jensen CJ, Nowicki D, Chen S, Palu A, Anderson G. 2002. *Morinda citrifolia* (Noni): A literature review and recent advances in Noni research. *Acta Pharmacol Sin.* 23 (12): 1127-1141.
- Wei S, Ilona K, Weiping Z. 2006. Regulatory T-cell Compartmentalization and Trafficking. *Blood* 108 (2): 426-431.
- Ziegler C, Oliver G, Elias H, Robert G, Georg P, Eva M. 2011. The Dynamics of T Cells during Persistent *Staphylococcus aureus* infection: from antigen-reactivity to in vivo anergy. *EMBO Mol Med* 3:652-666.