

Analisis Mobilisasi Sel T CD4⁺ dan CD8⁺ pada Timus Ayam Pedaging Pasca Infeksi *Salmonella typhimurium* dan Pemberian Simplisia *Polyscias obtusa*

Swastika Pinca¹, Muhammad Sasmito Djati¹, Muhaimin Rifa'i¹

¹Laboratorium Fisiologi Hewan, Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Universitas Brawijaya, Malang

Swastika Pinca: swastika.pinca@gmail.com

M. Sasmito Djati: msdjati@ub.ac.id

ABSTRAK

Penggunaan antibiotik dalam pakan sebagai perlindungan bagi ternak dari penyakit memiliki dampak negatif yakni adanya kandungan residu sehingga diperlukan adanya bahan substitusi antibiotik. Simplisia daun kedondong laut (*Polyscias obtusa*) diduga mengandung senyawa flavonoid yang diduga dapat berperan sebagai agen imunomodulator dalam sistem imun seluler. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui peran kandungan simplisia daun *Polyscias obtusa* dalam pakan ayam sebagai imunomodulator pada ayam yang telah diinfeksi bakteri *Salmonella typhimurium*, ditinjau dari profil ekspresi CD4⁺, CD8⁺ dan B220⁺ yang dianalisis melalui Flowcytometri. Tahapan penelitian meliputi uji konfirmasi bakteri *S.typhimurium*, persiapan kultur bakteri dan simplisia daun *P. obtusa*, infeksi bakteri secara oral 500 µl, pembuatan pakan konversi dengan perlakuan simplisia dosis 1 (0.08%), dosis 2 (0.16%) dan dosis 3 (0.26%), isolasi organ timus dan sel T-limfosit dan analisis flowcytometri. Hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa jumlah relatif CD4⁺, CD8⁺ dan B220⁺ mengalami peningkatan pada perlakuan pakan pabrik+infeksi bakteri *Salmonella* dan perlakuan penambahan simplisia dosis 2 (0.16%) dengan hasil yang berbeda nyata berdasarkan waktu pemberian pada jumlah relatif sel CD8⁺. Hal ini membuktikan bahwa simplisia daun *P. obtusa* memiliki kemampuan dalam memaksimalkan fungsi sistem imun.

Kata Kunci : Ayam Pedaging, *Polyscias obtusa*, *Salmonella typhimurium*, T-limfosit dan Timus

ABSTRACT

Antibiotics usually use to protect the animals from pathogens, but antibiotics have a residues which have negative side effect. Antibiotics can substituted with *Polyscias obtusa* simplicia because this plant contains a chemical compound called Flavonoid which can play role immune system as immunomodulator. This study aimed to determine the mobilization and development of CD4⁺, CD8⁺ and B220⁺ T Cells lymphocytes from thymus of broiler that have been given additional feed *Polyscias obtusa* after infected *Salmonella typhimurium* and determine the optimum dose of the addition of simplicia's *Polyscias obtusa* which can influence the mobilization of T Cells lymphocyte in Thymus. The procedure are confirmation of the *Salmonella typhimurium* isolates, prepare the simplicia's *Polyscias obtusa* and *Salmonella typhimurium* bacterial culture, orally infections in 500 µl, prepare supplemented feeds by three doses there are dose 1 (0.08%), dose 2 (0.16%) and dose 3 (0.26%), thymus and T Cells lymphocytes isolation and Flow Cytometry analysis. The results showed that feeding with antibiotal feed+*Salmonella* infection and natural feed with additional *Polyscias obtusa* simplicia's dose 2 (0.16%) have to incarase the relativity amount CD4⁺, CD8⁺ and B220⁺ T Cells lymphocytes of thymus with that time feeding period have significantly differences for relativity amount of CD8⁺. This result give evidence *Polyscias obtusa* simplicia's have an ability and influence to increasing the body's immune system.

Keywords : Broiler, *Polyscias obtusa*, *Salmonella typhimurium*, T-Cells lymphocyte and Thymus

PENDAHULUAN

Penggunaan antibiotik Bacitracin, kuramicin, higramomicin, kolistin, kiamisin, spiramisin, tiamulin, virginiamisin, aviamisin, flavomisin dan tetrasiklin biasa ditambahkan kedalam dalam pakan sebagai perlindungan bagi ternak dari penyakit [1]. Hal tersebut memiliki

dampak negatif yakni adanya kandungan residu sehingga diperlukan adanya bahan substitusi antibiotik karena antibiotik kimiawi dalam pakan ayam dapat terakumulasi dalam tubuh dan dapat menyebabkan resistensi [2]. Simplisia daun kedondong laut (*Polyscias obtusa*) diduga mengandung senyawa flavonoid yang diduga

dapat berperan sebagai agen imunomodulator dalam sistem imun seluler.

Senyawa dalam *P. obtusa* diduga memiliki kemampuan sebagai imunomodulator karena berdasarkan hasil fitokimia sebagian besar tanaman *Polyscias* mengandung flavonoid yang berupa senyawa steroid dan glikosida triterpenoid. Senyawa flavonoid dikenal berperan sebagai agen imunomodulator, antiviral dan antioksidan [3]. Kandungan flavonoid dalam daun kedondong laut diharapkan dapat menjadi induksi bagi produksi sel imunomodulator khususnya sel CD4⁺ dan CD8⁺ pada organ timus.

Senyawa flavonoid diduga mempunyai aktivitas seperti IFN- γ yang menginduksi dan mengaktifasi makrofag dan limfosit T. Aktivasi makrofag akan mensekresi sitokin (IL-1, IL-6, IL-12 dan TNF- α) dan mengaktifasi sel T. Aktivasi sel T tersebut mensekresi IFN- γ yang menghambat diferensiasi produksi antibodi oleh sel B. Aktivitas IFN- γ yang mampu memediasi respon imun seluler teraktivasi, ketika respon imun humoral ditekan produksinya [4]. Senyawa flavonoid diduga juga dapat memacu proliferasi limfosit, meningkatkan jumlah sel T dan meningkatkan aktivitas IL-2 [5].

Sistem kekebalan pada unggas terdiri dari innate immunity (kekebalan nonspesifik) yakni heterophils, sel makrofag dan sel NK, sedangkan sistem kekebalan spesifik terdiri dari dua kelompok utama, yaitu kekebalan humoral dan Cell Mediated Immunity (CMI) [6]. Sistem imun ayam dalam penelitian ini ditantang dengan infeksi bakteri *Salmonella typhimurium* yang merupakan bakteri penyebab penyakit pencernaan pada hewan ternak. Bakteri ini bersifat patogen, tahapan yakni infeksi meliputi proses perusakan dinding usus dengan degramadasi epitel dan infeksi dinding usus yang dapat menyebabkan gangguan metabolisme dan pertumbuhan mikroflora [7].

METODE PENELITIAN

Waktu dan Tempat

Kegiatan penelitian dilakukan pada Maret-September 2012 di laboratorium Mikrobiologi, Laboratorium Fisiologi Hewan, Fakultas MIPA, Jurusan Biologi, serta Laboratorium Lapang Sumber Sekar-DAU Fakultas Peternakan, Universitas Brawijaya, Malang.

Alat dan Bahan

Alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain adalah kandang, lampu, tempat pakan

dan tempat minum ayam, sekam, tabung reaksi, cawan petri, oose, bunsen, pipet volume, bola hisap, Erlenmeyer, mikropipet dan *blue tip*. Sedangkan bahan-bahan yang digunakan antara lain adalah media XLD, KIA, LIA, NB, NA, cat gram A, B, C dan D, larutan H₂O₂, aquades, pakan pabrik BR1, ransum (jagung kuning, DL Metionin, tepung ikan, precampuran, bungkil kopra, bungkil kedelai dan garam) dan air mineral.

Uji Konfirmasi

Uji Media XLD

Koloni hasil peremajaan diinokulasikan pada media XLD (*Xylose Lysine Deoxycholate*) dan diinkubasi selama 24 jam 37^oC. Koloni positif pada media XLD ditunjukkan dengan koloni berwarna hitam, diambil dan dilanjutkan pada uji selanjutnya.

Uji Katalase

Isolat bakteri murni hasil diletakkan pada gelas obyek yang telah ditetesi dengan hidrogen peroksida (H₂O₂) 3% sebanyak satu tetes. Uji positif ditunjukkan ketika terdapat gelembung gas pada hasil akhir.

Uji Pewarnaan Cat Gram

Koloni positif pada XLD diapus diatas gelas objek steril, kemudian gelas objek difiksasi diatas api dan ditetesi cat gram A (*Hucker's crystal violet*), cat gram B (*Lugol's iodine*), cat gram C (alkohol), cat gram D (safranin) secara berurutan masing-masing selama 1 menit dan dicuci dengan air mengalir kemudian dibiarkan hingga kering dan diamati morfologinya. Hasil menunjukkan bahwa bakteri bersifat gram negative karena menunjukkan warna merah.

Uji KIA LIA

Koloni positif diambil dengan jarum enten dan ditusukkan pada media KIA dan LIA slant dan ditarik garis hingga terbentuk belahan pada slant, kemudian diinkubasi pada suhu 37^oC selama 24-48 jam dan diamati perubahannya. Koloni hitam pada media menandakan hasil positif.

Kurva Pertumbuhan

Kultur bakteri diambil 1 ose kemudian ditumbuhkan pada media *Nutrien Broth* 10 ml dan diinkubasi suhu 37^oC selama 24 jam. 6 ml kultur dan dicampur 54 ml media NB. Kemudian dilakukan sampling setiap 1 jam, dengan mengambil 4 ml dan ditambah 500 μ l formalin

yang selanjutnya dihitung absorbansinya dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 600nm dan diukur jumlah selnya dengan haemocytometer.

Kurva Standar

Suspensi isolate dikultur dengan media *Nutrien Broth* dengan perbandingan konsentrasi berbeda (Pengenceran). Masing-masing suspensi dihitung absorbansinya dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 600 nm dan diukur jumlah selnya dengan haemocytometer. Tabel 1 menunjukkan Perbandingan antara media steril dan kultur.

Tabel 1. Perbandingan stok bakteri *Salmonella typhimurium* dengan media steril

| Perbandingan | Stok kultur (ml) | Media Steril (ml) |
|--------------|------------------|-------------------|
| 8:0 | 0 | 4 |
| 7:1 | 0,5 | 3,5 |
| 6:2 | 1 | 3 |
| 5:3 | 1,5 | 2,5 |
| 4:4 | 2 | 2 |
| 3:5 | 2,5 | 1,5 |
| 2:6 | 3 | 1 |
| 1:7 | 3,5 | 0,5 |
| 0:8 | 4 ml | 0 |

Pembuatan Pakan Konversi

Daun *P. obtusa* dicuci, dikering anginkan dan dihaluskan dengan blender kering, kemudian ditimbang untuk bahan tambahan pada pakan konversi sesuai perlakuan yakni dosis 1 0,08% dari total jumlah pakan, dosis 2 0,16% dan dosis 3 sebanyak 0,26% simplisia dari total jumlah pakan. Pembuatan pakan konversi dilakukan secara bertahap yakni dengan komposisi pakan dengan persentase paling rendah hingga paling tinggi.

Infeksi Oral *Salmonella typhimurium*

Bakteri *Salmonella typhimurium* dalam *Nutrient Broth* disentrifuse dengan kecepatan 10.000 rpm selama 10 menit suhu 25⁰ C. Pellet yang diperoleh diresuspensi dengan larutan garam fisiologis NaCl 0,9% yang kemudian diambil sebanyak 500 µl dan dicekakkan secara oral (melewati mulut) pada pada ayam perlakuan infeksi.

Isolasi Sel Limfosit

Isolasi sel limfosit dilakukan dalam 2 tahap yakni tahap starter yaitu pembedahan pada umur 17 hari dan tahap finisher yaitu

pembedahan pada umur 35 hari. Timus hasil isolasi digerus dengan pangkal spuit diatas *wire* steril sebagai filter. Homogenat yang didapatkan dimasukkan kedalam tabung propilen 15 ml dan ditambahkan PBS yang kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 2500 rpm, pada suhu 4⁰C, selama 5 menit hingga didapatkan pellet kemudian disentrifugasi kembali hingga didapatkan pellet yang merupakan sel limfosit.

Analisis Flowcytometri

Sel-sel hasil isolasi dari organ timus yang telah ditambahkan antibodi Mouse anti-CD4, Mouse anti-CD8 dan Mouse anti-B220 dikonjugasi dengan label PE untuk CD8, PerCP untuk CD45 atau B220, dan FITC untuk CD4. Sampel tersebut kemudian ditambah 1 ml PBS dan ditempatkan pada kuvet flowcytometer. Flowcytometer akan menghitung jumlah sel total serta jumlah sel yang terdeteksi oleh label antibody, kemudian hasil yang diperoleh diolah dengan program *BD cellquest Pro™*.

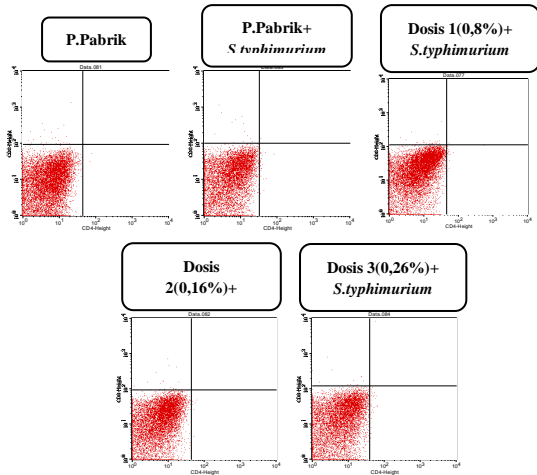
Analisis Statistika

Analisis data dilakukan dengan menggunakan metode One Way ANOVA RAL-Faktorial pada program *SPSS 16 for Windows*. Analisis selanjutnya dengan menggunakan analisis varian ganda. Apabila diperoleh hasil yang signifikan maka dilakukan uji lanjut Duncan.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Analisis Jumlah Relatif Sel CD4⁺ dan CD8⁺ pada organ Timus Fase Starter dengan Flowcytometry

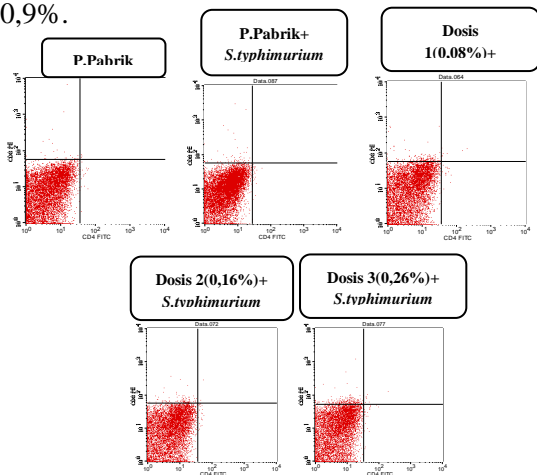
Hasil jumlah relatif sel CD4⁺ dan CD8⁺ dengan analisa Flowcytometry tidak menunjukkan perbedaan yang signifikan dari masing-masing perlakuan pada timus hasil pembedahan fase starter. Perlakuan pemberian pakan pabrik (A1B1) dan pemberian pakan pabrik+infeksi *S.typhimurium* (A2B1) menunjukkan jumlah relatif sel CD8⁺ yang lebih tinggi dari jumlah CD4⁺ yakni sebesar 0,31% dan 0,5%. Perlakuan pemberian pakan konversi dosis 1, dosis 2 dan dosis 3 (A3B1, A4B1 dan A5B1) juga menunjukkan jumlah sel CD8⁺ yang lebih tinggi dari jumlah CD4⁺ secara berturut-turut yakni 0,6%, 0,7% dan 0,5% .



Gambar 1. Profil Jumlah Relatif Sel CD4⁺ dan CD8⁺ Fase Starter

Analisis Jumlah Relatif Sel CD4⁺ dan CD8⁺ pada organ Timus Fase Finisher dengan Flowcytometry

Hasil jumlah relatif sel CD4⁺ dan CD8⁺ dengan analisa Flowcytometry menunjukan bahwa jumlah relatif sel limfosit dari masing-masing perlakuan pada timus hasil pembedahan fase finisher tidak menunjukan perbedaan yang signifikan. Jumlah relatif sel CD8⁺ tertinggi terdapat pada perlakuan kontrol negatif (A1B2) yakni dengan pemberian pakan pabrik saja yaitu sebesar 1,6%, sedangkan jumlah relatif sel CD4⁺ tertinggi terdapat pada perlakuan pemberian pakan konversi dosis 2 (A4B2) yaitu sebesar 0,9%.



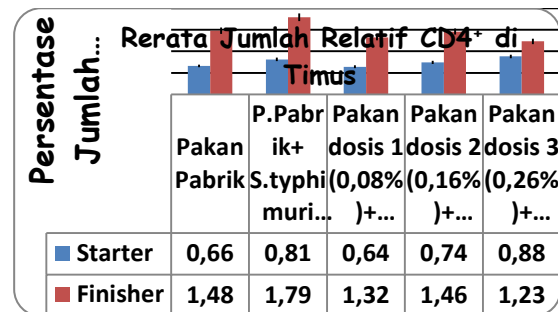
Gambar 2. Profil Jumlah Relatif Sel CD4⁺ dan CD8⁺ Fase Finisher

Hasil jumlah relatif sel limfosit yang menunjukan perbedaan yang tidak signifikan ini diduga karena waktu perlakuan yang masih dalam tahap adaptasi. Respon antibodi pada hewan muda mungkin hanya terbatas pada epitop antigen tertentu karena pada hewan muda respon imunologiknya masih berada pada tingkatan imunologis paling rendah [8].

Pemberian antigen *S. typhimurium* pada anak ayam umur 1–2 minggu hanya menimbulkan respon antibodi yang lemah. Kondisi ini mungkin disebabkan oleh sifat hiporesponsif sel-sel pada system imunitas yang belum berfungsi secara mature, atau diseminasi jaringan limfoid masih sangat muda dan fungsi pembentukan antibodi belum sempurna, sehingga antibodi yang terbentuk pada anak ayam rendah [9].

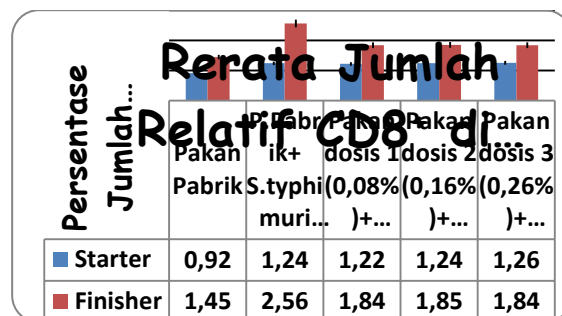
Perbandingan Rata-rata Jumlah Relatif Sel CD4⁺ dan CD8⁺ pada organ Timus Fase Starter dan Finisher

Hasil yang didapatkan dari hasil perbandingan jumlah relatif sel CD4⁺ fase starter dan finisher menunjukkan jumlah yang tidak signifikan. Jumlah rata-rata tertinggi baik pada fase starter dan finisher didapatkan pada perlakuan A2 yakni pemberian pakan pabrik dan infeksi *S.typhimurium* yaitu 0,81% pada fase starter dan 1,79% pada fase finisher.



Gambar 3. Rata-rata Jumlah Sel T CD4⁺ (%) fase Starter dan Finisher (p<0.05)

Hasil yang didapatkan dari hasil perbandingan jumlah relatif sel CD8⁺ fase starter dan finisher juga menunjukan jumlah yang tidak signifikan. Jumlah rata-rata tertinggi baik pada fase starter dan finisher didapatkan pada perlakuan A2 yakni pemberian pakan pabrik dan infeksi *S.typhimurium* yaitu 1,24% pada fase starter dan 2,56% pada fase finisher.



Gambar 4. Rata-rata Jumlah Sel T CD8⁺ (%) fase Starter dan Finisher (p<0.05)

Sifat flavonoid sebagai imunomodulator dapat berubah menjadi immunosupressan terhadap rerata indeks daya fagosit makrofag, ketika diberikan dalam dosis yang besar dan dalam jangka waktu yang lama. Hal ini diduga mempengaruhi hasil jumlah relatif CD8⁺ yang berbeda nyata (signifikan) antara fase starter dan finisher. Perbandingan jumlah relatif yang tidak berbeda nyata pada CD4⁺ diduga diakibatkan adanya produksi hormon kortisol akibat stres pada hewan coba (ayam), ketika jumlah hormon kortisol naik maka dapat menghambat produksi IL-1 pada makrofag dan IL-2 pada sel T, hal ini mengakibatkan respon sel T terhadap antigen menjadi berkurang dan menurunkan jumlah sel T dan sel B [10].

Perbandingan jumlah relatif sel CD8⁺ pada fase starter dan finisher setelah dilakukan analisis ANOVA menunjukkan hasil yang berbeda nyata yakni sebesar 0,001 pada lama perlakuan yang dibedakan menjadi starter dan finisher, hal ini menunjukkan bahwa lamanya perlakuan dapat menimbulkan hasil yang berbeda nyata pada jumlah relatif sel CD8⁺.

Tabel 2. Hasil Analisis Ragam ANOVA Jumlah Relatif Sel T CD4⁺ pada Timus fase Starter dan Finisher (p<0.05)

| Tests of Between-Subjects Effects | | | | | |
|-----------------------------------|-------------------------|----|-------------|---------|------|
| Dependent Variable: Data | | | | | |
| Source | Type III Sum of Squares | df | Mean Square | F | Sig. |
| Corrected Model | 6.255 ^a | 9 | .695 | 2.523 | .041 |
| Intercept | 71.086 | 1 | 71.086 | 258.021 | .000 |
| Infeksi | 4.063 | 1 | 4.063 | 14.746 | .001 |
| Perlakuan | 1.537 | 4 | .384 | 1.395 | .272 |
| Infeksi * Perlakuan | .655 | 4 | .164 | .594 | .671 |
| Error | 5.510 | 20 | .276 | | |
| Total | 82.851 | 30 | | | |
| Corrected Total | 11.765 | 29 | | | |

a. R Squared = .532 (Adjusted R Squared = .321)

KESIMPULAN

hasil yakni tidak terdapat perbedaan yang signifikan dari jumlah relatif sel limfosit ditinjau dari profil sel CD4⁺ dan CD8⁺ berdasarkan analisis *flowcytometry*. Perlakuan yang paling berperan dalam peningkatan jumlah sel limfosit adalah perlakuan A2 yakni perlakuan dengan pemberian pakan pabrik dengan infeksi bakteri *Salmonella typhimurium* dan dari analisis ANOVA diketahui bahwa pengaruh lama perlakuan menghasilkan hasil yang berbeda nyata pada jumlah relatif sel CD8⁺.

UCAPAN TERIMA KASIH

Bapak Dr. Ir. Moch.Sasmito Djati.,MS dan Bapak Muhaimin Rifa'i.,PhD.Med.Sc selaku dosen pembimbing. Bapak Widodo.,PhD., Med.Sc selaku dosen penguji, Ibu Nanik Utami dan Bapak Djatmiko E.S. selaku kedua orang tua, Mbak Dewi Satwika, Mbak Septi Utami, Andi Rizky, Mutya Farsely, Erin Kurnianingtyas selaku partner tim penelitian, S. Fatiyatur Rahmah, Roudotul Jannah dan Bayu Hendra sebagai sahabat yang selalu mendukung, Teman-teman "BIO 2009" serta semua pihak lain yang turut mendukung kelancaran penelitian, serta Jurusan Biologi, FMIPA, Universitas Brawijaya Malang sebagai almamater tercinta

DAFTAR PUSTAKA

- [1] [1]Direktorat Jenderal Peternakan. 1991. Ringkasan imbuhan pakan (Feed Additive) untuk hewan. Edisi II. Direktorat Jenderal Peternakan. Jakarta.
- [2] Zhang. X, Roland, D. A. and S. K. Roat. 1999. Effect of naturphos phytase supplementation to feed on performance and ileal digestibility of protein and amino acid of broiler. Poultry Sci.
- [3] Francis, G., Zohar K., Harinder, P.S.M., dan Klaus B. 2002. The biological action of flavonoids in animal systems. British Journal of Nutrition Vol.88, 587–605.
- [4]Takagi, Y., Choi, I., Yamashita, T., Nakamura, T., Suzuki, I., hasegawa, T., Oshima, M., Gu, Y. 2005. Immune Activation and Radioprotection by Propolis. The American Journal of Chinese Medicine. Vol 33 No. 3 231-240
- [5] Abbas AK, Litchman AH, Pober JS. 1994. Cellular Immunology in: Cellular and molecular immunology, 2nd ed. Philadelphia: WB. Saunders Company.
- [6] Schat, K.A. 1994. Cell-Mediated Immune Effector Functions In Chickens. Poult. Sci. 73: 1077 – 1081.
- [7]Lay B. W. dan Hastowo S. 1992. Mikrobiologi. Rajawali Press: Jakarta.
- [8] Thorns, C.J., I.M. Mc Laren And M.G. Sojka 1994. The Use Of Latex Agglutination To

- Specifically Detect Salmonella Enteritidis. *Int. J. Food Microbiol.* 21: 47– 49.
- [9] Jeurissen, S.H.M., E.M. Janse, G. Koch And G.F. Deboer. 1989. Post Natal Development Of Mucosa-Associated Lymphoid Tissue In Chickens. *Cell Tissue Res.* 258: 119 – 124.
- [10] Mc Cance K.L. and J. Shelby. 1995. Stress and Disease. In : Pathophysiology. The Biologic Basis in Adult and Children, London.
- [11] Rifa'i, M., Lee, YH (2011), CD4+CD25+FOXP3+ Regulatory T Cells In Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation, *Jtrolis.*, 1 (2), 69-75.
- [12] YH Lee, 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
- [13] M Rifa'i, 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
- [14] Endharti AT, Rifa'i M, Shi Z, Fukuoka Y, Nakahara 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
- [15] YH Lee, 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
- [16] M Rifa'i, Z Shi, SY Zhang, YH 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
- [17] Z Shi, Y Okuno, M Rifa'i, AT 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
- [18] Z Shi, M Rifa'i, YH 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
- [19] Rifa'i, M. 2010. Andrographolide ameliorate rheumatoid arthritis by promoting the development of regulatory T cells. *Journal of Tropical Life Science* 1 (1), pp. 5-8
- [20] YH Lee, M Rifa'i. 2011. CD4+CD25+FOXP3+ Regulatory T Cells In Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation. *Journal of Tropical Life Science* 1 (2), 69-75